

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL – UCS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

PAULO ROBERTO DOS SANTOS

**COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DO ÁCIDO VALPROICO E METAIS DE
TRANSIÇÃO COMO MEDICAMENTOS**

CAXIAS DO SUL

2014

PAULO ROBERTO DOS SANTOS

**COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DO ÁCIDO VALPROICO E METAIS DE
TRANSIÇÃO COMO MEDICAMENTOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul visando à
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.**

Orientador: Prof^o Dr Sidnei Moura e Silva

CAXIAS DO SUL

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S237c Santos, Paulo Roberto dos, 1983-
Compostos de coordenação do ácido valproico e metais de transição
como medicamentos / Paulo Roberto dos Santos. - 2014.
99 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva.

1. Ácido valproico. 2. Princípio ativo 3. Toxicologia. 4. Compostos de
coordenação. 5. Metais de transição I. Título.

CDU 2.ed.: 615.213

Índice para o catálogo sistemático:

1. Ácido valproico	615.213
2. Princípio ativo	615.015.11
3. Toxicologia	615.9
4. Compostos de coordenação	547-3-3 86
5. Metais de transição	546.302

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Nicole Tirello Acquilini – CRB 10/2297

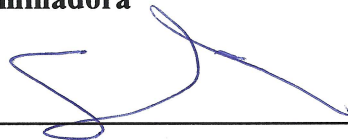
PAULO ROBERTO DOS SANTOS

**COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DO ÁCIDO VALPROICO E METAIS DE
TRANSIÇÃO COMO MEDICAMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Dissertação aprovada em 07 de outubro de 2014.

Banca Examinadora



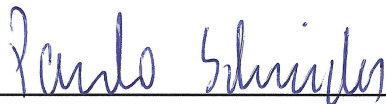
Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Universidade de Caxias do Sul – UCS



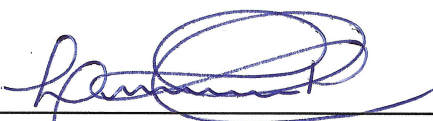
Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

Universidade de São Paulo – USP



Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS



Prof. Dr. Leandro Tasso

Universidade de Caxias do Sul – UCS

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha esposa Sidineia pelo companheirismo, ajuda e compreensão durante a execução deste trabalho.

Ao orientador Dr Sidnei Moura pela orientação e o empenho apresentado para que os resultados fossem alcançados.

Aos bolsistas Maicon Pasa, Franciele Menegat e Carolina Tedesco pelo auxílio durante a pesquisa, o qual se mostrou indispensável para a obtenção de resultados.

À mestranda Lauren Dockhorn Grünspan e à Msc Rafaele Frassini pelo empenho apresentado para execução os protocolos de citotoxicidade.

Aos colegas do laboratório LBIOP pela colaboração no projeto, camaradagem e momentos de descontração.

Ao Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA sob o comando da Dr^a Mariana Roesch Ely pela colaboração oferecida para os ensaios de citotoxicidade.

Ao Laboratório de Estresse Oxidativo sob o comando da Dr^a Mirian Salvador pela colaboração na execução dos protocolos de atividade antioxidante.

Ao Instituto de Biotecnologia pelo fomento à pesquisa.

À UCS pela infraestrutura oferecida para o desenvolvimento da pesquisa.

À Dr^a Françoise Dumas pelo auxílio técnico-científico.

Ao programa de pós-graduação em materiais (PGMAT), em especial as professores Dr Otávio Bianchi e Dr Cláudio Perottoni pelas colaborações pelas análises de FTIR e as demais colaborações oferecidas.

Ao Prof^o Dr Almir Luis Brancher pela colaboração para obtenção dos complexos organometálicos.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFRGS - Campus do Vale pelas análises de RMN.

À CAPES pelo fomento ao mestrado.

RESUMO

O ácido valproico (AVP) é um fármaco de primeira linha no tratamento de convulsões parciais e generalizadas, porém os efeitos colaterais decorrentes das altas doses administradas produzem danos hepáticos por metabolização. O AVP apresenta alta afinidade com metais de transição e produz compostos de coordenação quimicamente estáveis. O presente estudo teve como objetivos sintetizar quatro complexos de AVP com Cu^{+2} e Zn^{+2} ligados com diiminas aromáticas 1,10-fenantrolina (Phen) e 2,2'-bipiridina (Bipy), determinar as estruturas químicas por espectrofotometria de absorção atômica (FAAS), espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massas de alta resolução (ESI-TOF-MS), e espectrometria de ressonância magnética nuclear (^1H RMN e ^{13}C RMN), avaliar as atividades antioxidantes por ensaios de *Sod-like* e *Cat-like* e determinar a citotoxicidade aguda frente à *Artemia salina* e à cultura celular CHO. O processo de síntese iniciou-se com a preparação dos compostos precursores $\text{Cu}_2(\text{Valp})_4$ (1) e $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ (2) pela reação do valproato de sódio com os sais CuCl_2 e ZnCl_2 em meio aquoso. As estruturas químicas foram confirmadas por Ponto de Fusão, FAAS, FTIR, ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os compostos de coordenação $\text{Cu}(\text{Valp})_2(1,10\text{-Phen})$ (3), $\text{Cu}(\text{Valp})_2(2,2\text{-Bipy})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4), $\text{Zn}(\text{Valp})_2(1,10\text{-Phen})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5) e $\text{Zn}(\text{Valp})_2(2,2\text{-Bipy})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6) (inérito) foram sintetizados pela reação equimolar dos compostos 1 e 2 com os respectivos ligantes neutros 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridina em solvente DMF. Os dados das estruturas químicas dos compostos 3 e 4 foram obtidos por PF, UV-Vis, FAAS, FTIR e ESI TOF-MS e confirmados por comparação com dados da literatura. Os compostos 5 e 6 (inérito) foram analisados por PF, UV-Vis, FAAS, FTIR, ESI TOF-MS, ^1H RMN e ^{13}C RMN, e suas estruturas químicas foram confirmadas por comparação com a literatura (5) e por interpretação de espectros (6). O experimento de *Sod-like* para os compostos 3, 4, 5 e 6 não expressou atividade aparente para a metodologia utilizada, porém todos expressaram atividade de *Cat-like*. O experimento de citotoxicidade aguda frente à *A. salina* indicou haver correlação dose/resposta para as diferentes concentrações testadas dos compostos 3, 4, 5 e 6 e para os controles 1,10-Phen, 2,2-Bipy e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. O composto 3 mostrou-se o mais tóxico (CL_{50} : $2 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguido do composto 5 (CL_{50} : $78 \mu\text{g mL}^{-1}$), composto 4 (CL_{50} : $386 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o composto 6 menos tóxico (CL_{50} : $409 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados indicam haver maior toxicidade dos compostos com cobre, caso similar observado para os compostos com 1,10-Phen. Os experimentos de citotoxicidade aguda dos compostos 5 e 6 frente à linhagem celular CHO com 24 horas de exposição nas concentrações de 25, 20, 15, 10, 5 e $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ não expressaram toxicidade para a metodologia utilizada. Os resultados corroboram com aqueles obtidos no ensaio de *A. salina*.

Palavras-chave: Ácido Valproico, Zinco, Cobre, Compostos de Coordenação, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Valproic acid (VPA) is a first-line drug in the treatment of seizures in general, but the side effects from high doses produce liver damage by metabolism. VPA has high affinity for transition metals and produces chemically stable coordination compounds. The present study aimed to synthesize four complexes VPA with Cu^{+2} and Zn^{+2} with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine linked aromatic diimines, determine the chemical structures by FAAS, FTIR, ESI-TOF MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR, evaluate the antioxidant activities by Sod-like and Cat-like and determine acute cytotoxicity front of *Artemia salina* (brine shrimp) and CHO cell culture. The synthesis procedure began with the preparation of precursor compounds $\text{Cu}_2(\text{Valp})_4$ (1) and $\text{Zn}_2(\text{Valp})_4$ (2) by the reaction of Sodium Valproate with chlorides of metals in aqueous medium. The chemical structures were confirmed by MP, FAAS, FTIR, ^1H NMR and ^{13}C NMR. Coordination compounds $\text{Cu}(\text{Valp})_2(1,10\text{-Phen})$ (3) $\text{Cu}(\text{Valp})_2(2,2\text{-Bipy})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4), $\text{Zn}(\text{Valp})_2(1,10\text{-Phen})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5) and $\text{Zn}(\text{Valp})_2(2,2\text{-Bipy})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6) (unpublished) were synthesized by equimolar reaction of compounds 1 and 2 with the corresponding neutral ligands 1,10-phenanthroline and 2,2-bipyridine in DMF solvent. The data of chemical structures of compounds 3 and 4 were obtained by MP, UV-Vis, FAAS, FTIR and ESI-TOF MS and confirmed by comparison with the literature data. Compounds 5 and 6 (unpublished) were analyzed for MP, UV-Vis, FAAS, FTIR, ESI TOF-MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR, and their chemical structures were confirmed by comparison with the literature (5) and interpretation spectra (6). The Sod-like experiments for compounds 3, 4, 5 and 6 were not significant, but all showed activity of Cat-like. The experiment of acute cytotoxicity in *A. salina* showed significant for compounds 3, 4, 5 and 6 in 8 different concentrations tested results. Compound 3 was found to be the most toxic (LC_{50} : 2 mg mL^{-1}), followed by compound 5 (LC_{50} : 78 mg mL^{-1}), compound 4 (LC_{50} : 386 mg mL^{-1}) and less toxic compound 6 (LC_{50} : 409 mg mL^{-1}). It can be observed correlation affix the higher toxicity of the compounds with copper, the case that observed for similar compounds with 1,10-Phen. The experiments of acute cytotoxicity of compounds 5 and 6 against CHO cell lines after 24 hours of exposure at concentrations of 25, 20, 15, 10, 5 and $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ showed no significant differences in toxicities to controls. The results corroborate the results obtained using the *A. salina*.

Keywords: Valproic Acid, Zinc, Copper, Coordination Compounds, Cytotoxicity.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: Grau Celsius
μL: microlitro
μmol L⁻¹: micromol por litro, micromolar
¹³C: Isótopo do carbono com 13 unidades de massa atômica (6 prótons e 7 nêutrons)
¹³C RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
¹H: Isótopo do hidrogênio com 1 unidade de massa atômica (1 próton)
¹H RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
⁹⁹Tc: Tecnécio 99 metaestável
ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
AVP: Ácido Valproico
Bipy: 2,2-bipiridina
Cat: Catalase
CDCl₃: Clorofórmio deuterado
CHO: Célula de Ovário de Hamster
CL₅₀: Concentração Letal para 50% da população amostrada
cm⁻¹: Número de Onda
Da: Dalton - Unidade de Massa Atômica
ddp: diferença de potencial
DMF: N,N,dimetilformamida
DTPA: Dietileno Triamino Penta Acetato
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
ESI: Fonte de Eletro spray
eV: Elétron-Volt
FAAS: Espectrofotometria de Absorção Atômica de Chama
FDA: Administração de alimentos e medicamentos (EUA)
FTIR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HDAC: Histona Desacetilase
HD-MS: Espectrometria de Massas de Alta Resolução
Hz: Hertz (Frequencia de ciclos)
J: Constante de acoplamento de spins nucleares
m/m: % massa/massa
MHz: megahertz
mmol: milimol
MW: Massa molar
NAE: Número Atômico Efetivo
NS: Não significativo
O⁻: Radical ânion superóxido
O⁻¹: Peróxido
PF: Ponto de fusão
Phen: 1,10-fenantrolina, o-fenantrolina
ppm: Parte por milhão
SD: Desvio Padrão
Sod: Superóxido dismutase
T: Tesla (Unidade de Indução magnética, Força de campo magnético)
TAS: Teste de Artemia salina
TOF-MS: Espectrometria de Massas por Tempo de Voo
Tween 80: Polissorbato 80 quilodaltons
UV-Vis: Espectrofotometria de Ultravioleta e Visível
V: Volt

Valp: Íon Valproato
W: Watt
 δ : Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arranjos espaciais mais comuns da esfera de coordenação metal-ligantes.....	19
Figura 2 - Principais biocomplexos metálicos derivados do grupo porfirina.....	20
Figura 3 - Complexos oncológicos derivados da platina e o ano de aprovação pelo FDA.	22
Figura 4 - Ácido valproico e seus derivados comerciais desenvolvidos pela Abbott Laboratories.....	24
Figura 5 - Principais rotas de biotransformação do AVP e seus metabólitos.....	25
Figura 6 - Complexos metálicos do AVP.....	26
Figura 7 - Geração de EROs e o dano causado ao DNA por complexo de cobre.....	29
Figura 8 - Reação de equilíbrio controlada pela anidrase carbônica.....	30
Figura 9 - Esquema dos elementos básicos de um espectrômetro de massas.....	32
Figura 10 - Esquema básico da fonte ESI operando em modo íons positivos.....	33
Figura 11 - Esquema do fluxo eletrônico na atividade da SOD.....	36
Figura 12 - Mecanismo de dismutação do radical-ânion superóxido por Zn (II).....	37
Figura 13 - Micro crustáceo <i>A. salina</i>	39
Figura 14 - Redução enzimática do MTT à Formazan.....	41
Figura 15 - Rotas de síntese dos sais precursores $Cu_2(Valp)_4$ (1) e $Zn_2(Valp)_4$ (2).....	44
Figura 16 - Rotas de síntese dos complexos $Cu(Valp)_2(1,10-Phen)$ (3), $Cu(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (4), $Zn(Valp)_2(1,10-Phen).H_2O$ (5) e $Zn(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (6).....	46
Figura 17 - Microfotografias dos complexos $Cu(Valp)_2Phen$ (3), $Cu(Valp)_2Bipy.H_2O$ (4), $Zn(Valp)_2Phen.H_2O$ (5), $Zn(Valp)_2Bipy.H_2O$ (6).....	48
Figura 18 - Reação auto catalítica de oxidação da adrenalina a adrenocromo.....	51
Figura 19 - Sistema para eclosão e crescimento de <i>A. salina</i>	53
Figura 20 - Espectros de absorção no UV-Vis para os complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.....	58
Figura 21 - Espectro de FTIR do complexo precursor 1.....	59
Figura 22 - Espectro de FTIR do complexo precursor 2.....	60
Figura 23 - Espectro de FTIR do complexo 3.....	61
Figura 24 - Espectro de FTIR do complexo 4.....	62
Figura 25 - Espectro de FTIR do complexo 5.....	63
Figura 26 - Espectro de FTIR do complexo 6.....	64
Figura 27 - Espectro de 1H RMN do complexo 2.....	66
Figura 28 - Espectro de referência de 1H RMN para o AVP obtido em 500 MHz.....	67
Figura 29 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo 2.....	68
Figura 30 - Espectro de referência de ^{13}C RMN para o AVP obtido em 125 MHz.....	68

Figura 31 - Espectro de ^1H RMN do complexo 5.....	69
Figura 32 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo 5.	70
Figura 33 - Espectro de ^1H RMN do complexo 6.....	71
Figura 34 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo 6.	72
Figura 35 - Espectro de massas para $\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}$ (3) com a distribuição monoisotópica para o íon $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Cu}^+$	73
Figura 36 - Espectro de massas para $\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy.H}_2\text{O}$ (4) com a distribuição monoisotópica para o íon $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cu}^+$	75
Figura 37 - Espectro de massas para $\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen.H}_2\text{O}$ (5) com a distribuição monoisotópica para o íon $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{Zn}^+$	76
Figura 38 - Espectro de massas para $\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy.H}_2\text{O}$ (6) com distribuição monoisotópica para o íon $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_4\text{Zn}^+$	78
Figura 39 - Esquema do mecanismo da Reação de Fenton, análogo à catalase.....	81
Figura 40 - Gráficos de letalidade dos compostos 3, 4, 5 e 6 e dos controles Na Valp , $1,10\text{-phen}$, $2,2\text{-bipy}$ e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ frente a $A. salina$	84
Figura 41 - Gráficos de Viabilidade celular dos compostos 5 e 6 testados frente à linhagem celular CHO.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidades mássicas e molares dos reagentes para as sínteses dos sais precusores $Cu_2(Valp)_4$ (1) e $Zn_2(Valp)_4$ (2).	43
Tabela 2 - Quantidades dos reagentes para as sínteses dos complexos 3, 4, 5 e 6.	45
Tabela 3 - Rendimentos obtidos para os sais precusores 1 e 2.	56
Tabela 4 - Rendimentos obtidos para os complexos 3, 4, 5 e 6.	56
Tabela 5 - Pontos de fusão dos complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.	57
Tabela 6 - Teores de Cobre e Zinco determinados por FAAS para todos os complexos.	65
Tabela 7 - Fragmentos de massas para o complexo 3.	74
Tabela 8 - Fragmentos de massas para o complexo 4.	75
Tabela 9 - Fragmentos de massas para o complexo 5.	77
Tabela 10 - Fragmentos de massas para o complexo 6.	79
Tabela 11 - Atividades de Sod-like e Cat-like para os compostos 3, 4, 5 e 6.	80
Tabela 12 - Compostos 3, 4, 5, 6 e os controlos <i>Na Valp</i> , <i>1,10-Phen</i> , <i>2,2-Bipy</i> e $K_2Cr_2O_7$ testados frente a <i>A. salina</i>	83
Tabela 13 - Concentrações letais (CL_{50}) para os compostos 3, 4, 5, 6 e os controlos frente à <i>A. salina</i>	85
Tabela 14 - Viabilidade celular da linhagem CHO frente aos compostos 5 e 6.	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO	18
3.1.1	As funções dos compostos de coordenação nos sistemas biológicos	19
3.2	METAIS DE TRANSIÇÃO EM MEDICAMENTOS	21
3.3	ÁCIDO VALPROICO	24
3.4	COBRE	27
3.5	ZINCO	29
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO	30
3.6.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	30
3.6.2	Espectrometria de Massas por Tempo de Vôo	31
3.6.2.1	<i>Fonte de Electrospray (ESI)</i>	32
3.6.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	34
3.7	ENSAIOS DE ATIVIDADE REDOX	36
3.7.1	Atividade SOD-like	36
3.7.2	Atividade CAT-like	37
3.8	ENSAIOS BIOLÓGICOS DE CITOTOXICIDADE	38
3.8.1	Artemia salina	38
3.8.2	Culturas Celulares	40
3.8.2.1	<i>Viabilidade Celular (ensaio MTT): conceito e aplicações</i>	41
4	METODOLOGIA	43

4.1	REAGENTES PARA SÍNTESE	43
4.2	SÍNTESE DOS COMPLEXOS	43
4.2.1	Preparação dos sais de Valproato de Cu⁺² e Zn⁺² (1 e 2)	43
4.2.2	Preparação dos complexos com ligantes neutros 1,10-Phen e 2,2-Bipy	44
4.2.2.1	<i>Recuperação dos compostos 3, 4, 5 e 6</i>	46
4.3	ANÁLISES INSTRUMENTAIS PARA IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL	48
4.3.1	Determinação dos pontos de fusão (PF)	48
4.3.2	Análise dos grupos funcionais por FTIR	49
4.3.3	Determinação dos teores de Cobre e Zinco por FAAS	49
4.3.4	Análise de ¹H RMN e ¹³C RMN	50
4.3.5	Análise espectrofotométrica de UV-Vis	50
4.3.6	Análise de espectrometria de massas de alta resolução	50
4.4	ENSAIOS DE ATIVIDADE MIMÉTICA DE <i>SOD-LIKE</i> E <i>CAT-LIKE</i>	51
4.4.1	Ensaio de Sod-like	51
4.4.2	Ensaio de Cat-like	52
4.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS COM <i>ARTEMIA SALINA</i>	52
4.5.1	Eclosão dos cistos de <i>A. salina</i>	52
4.5.2	Preparo das amostras para incubação	53
4.5.3	Incubação	53
4.6	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR	54
4.6.1	Cultura de células	54
4.6.2	Ensaio MTT	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.2	RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DE SÍNTESE	56
5.3	ELUCIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPLEXOS	56
5.3.1	Análise dos pontos de fusão (PF)	57

5.3.2	Análise dos espectros de UV-Vis	57
5.3.3	Análise dos espectros de FTIR para todos os complexos	59
5.3.4	Análises dos teores de Cu e Zn nos complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6	65
5.3.5	Análise dos espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN	65
5.3.5.1	<i>Análise dos espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN para o complexo 2</i>	66
5.3.5.2	<i>Análise dos espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN para o complexo 5</i>	69
5.3.5.3	<i>Análise dos espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN para o complexo 6</i>	70
5.3.6	Análise dos espectros de massas	73
5.3.6.1	<i>Análise do espectro de massas do composto 3</i>	73
5.3.6.2	<i>Análise do espectro de massas do composto 4</i>	75
5.3.6.3	<i>Análise do espectro de massas do composto 5</i>	76
5.3.6.4	<i>Análise do espectro de massas do composto 6</i>	78
5.4	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MIMÉTICAS DE SOD-LIKE E CAT-LIKE ...	80
5.4.1	Atividade Sod-like	80
5.4.2	Atividade Cat-like	80
5.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA	82
5.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE A CULTURAS DE CÉLULAS CHO	86
6	CONCLUSÃO	88
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um medicamento novo demanda aproximadamente 15 anos e envolve investimentos na ordem de um bilhão de dólares. A principal razão que contribui para o alto custo está no fato de que a maioria das moléculas candidatas a fármacos são descartadas durante as fases de testes I e II em razão da toxicidade. Estatísticas mostram que apenas 0,1% das moléculas sintetizadas ou obtidas de fontes naturais testadas possuem potencial para se tornar um fármaco comercial. Para tanto, a estratégia mais sensata e econômica para se obter novos fármacos consiste em modificar quimicamente moléculas de fármacos conhecidos e testá-las para os mesmos moldes da molécula de partida, em modelo conhecido como bioisosterismo. Em muitos casos se obtém melhoramentos significativos na eficácia terapêutica.

A síntese de complexos metálicos é abordagem recente para a obtenção de bioisómeros de fármacos. Os organocomplexos ou compostos de coordenação são moléculas com função química mista, as quais consistem de moléculas orgânicas ligadas com um íon metálico em um arranjo geométrico conhecido como esfera de coordenação. A atividade biológica dos compostos metálicos de coordenação é de extrema importância para a manutenção da vida. Os sistemas biológicos utilizam complexos organometálicos como cofatores enzimáticos, em sítios ativos de enzimas e nas metaloproteínas. Os elementos ferro, manganês, cobre, molibdênio, zinco, cobalto e níquel são alguns dos metais mais presentes nos complexos biológicos.

O ácido valproico ou valproato (AVP) é um fármaco muito utilizado em estudos para produção de moléculas bioisómeras nos últimos vinte anos. Desde o seu lançamento em 1978, o AVP tem sido um fármaco de muito usado no tratamento de convulsões parciais e generalizadas em pacientes com quadros de epilepsia, atuando também como estabilizador do humor no tratamento de distúrbios bipolares e como moderador da enxaqueca. Esta molécula atua através de um mecanismo potencializador da atividade do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). O AVP é bastante eficaz, porém os efeitos colaterais decorrentes de doses diárias na ordem de $60 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ são bastante comuns. A taxa de metabolização do fármaco pelo fígado pode representar 80% da dose administrada, a qual induz a distúrbios hepáticos produzidos por metabólitos citotóxicos. O desenvolvimento de bioisómeros do AVP apresenta-se como uma estratégia para o desenvolvimento de moléculas análogas com atividades farmacológicas melhoradas.

O desenvolvimento de compostos de coordenação com metais de transição é uma abordagem recente para o desenvolvimento de moléculas bioativas. Muitas moléculas de fármacos possuem funções químicas com características de bases de Lewis (amina, carboxilato, álcool, sulfeto) que podem ser exploradas como ligantes em reações de complexação com cátions metálicos e produzir bioisómeros com características químicas alteradas. O AVP é um ácido graxo ramificado com grande afinidade química com cátions bivalentes de metais de transição como o Cu^{+2} e o Zn^{+2} . O grupo químico carboxilato deste composto interage com os cátions metálicos por ligação de valência e por coordenação, de modo que estas interações fortes produzem compostos de coordenação quimicamente estáveis.

A importância apresentada pelos compostos de coordenação para as funções biológicas torna uma opção relevante o uso de metais de transição para a modificação estrutural de moléculas de fármacos conhecidos. Portanto, moléculas com propriedades químicas favoráveis à formação de complexos, como o AVP, podem ser modificadas com intuito de potencializar seu efeito e, conseqüentemente, reduzir a dose administrada com redução dos efeitos colaterais. O desenvolvimento de bioisómeros derivados de metais de transição também representa um desafio, pelo fato de que a maioria dos metais de transição são tóxicos mesmo em doses baixas, o que torna a escolha do cátion metálico e dos ligantes a etapa mais criteriosa no projeto de protótipos moleculares desta natureza. Todavia, os complexos organometálicos mostram-se como uma alternativa para a indústria farmacêutica e tendem a ocupar cada vez mais espaço nos portfólios de medicamentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo obter compostos de coordenação derivados do AVP com os metais cobre e zinco e verificar as atividades citotóxicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os sais precursores divalproato de zinco (II) e divalproato de cobre (II) a partir do sal orgânico valproato de sódio e os sais inorgânicos cloreto de zinco (II) e cloreto de cobre (II) por reação de dupla-troca em solução.
- Obter quatro organocomplexos por complexação dos sais precursores divalproato de zinco (II) e divalproato de cobre (II) com os ligantes neutros 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina por síntese em solvente e cristalização.
- Determinar as estruturas químicas dos compostos por diferentes ferramentas analíticas: Espectrofotometrias de UV-Vis, FTIR e FAAS, Espectrometria de massas de alta resolução (ESI-TOF-MS) e Espectrometria de ^1H RMN e ^{13}C RMN.
- Avaliar as atividades antioxidantes dos complexos pelos ensaios de mimetização das enzimas redox superóxido dismutase e catalase *in vitro*.
- Avaliar as toxicidades agudas dos compostos pelos ensaios de letalidade com *Artemia salina* e de viabilidade celular com culturas de células CHO.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO

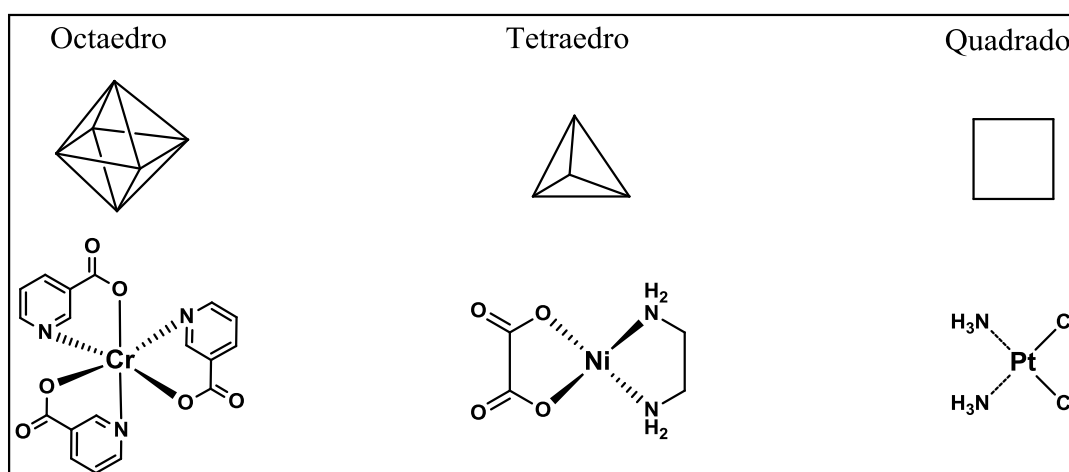
Um composto de coordenação pode ser descrito como um sistema coordenado com um átomo metálico e um ligante, que pode ser de natureza orgânica ou inorgânica (SHRIVER, 2008). A definição clássica representa os complexos ou compostos de coordenação como resultado de um mecanismo doador-aceptor ou de uma reação ácido-base de Lewis entre dois ou mais compostos químicos diferentes (SINKO, 2008). Esta propriedade de coordenação é resultado da alta energia de ligação dos orbitais *d*-vazios dos metais de transição (deficientes de elétrons) na presença de átomos nucleofílicos (oxigênio, nitrogênio), os quais possuem orbitais *p*-ligantes com pares de elétrons livres ou desemparelhados disponíveis para ligação. Deste modo, os elementos eletronegativos das famílias 14, 15, 16 e 17 coordenam com a maioria dos metais da tabela periódica para formarem arranjos iônicos e moleculares com inúmeras propriedades (SHRIVER, 2008).

A teoria de Werner diz que as ligações coordenadas são formadas entre os ligantes e o íon metálico central do complexo, isto é, o ligante doa um par de elétrons ao íon metálico. Compostos de coordenação podem ser formados facilmente com os metais de transição, pois estes possuem orbitais *d* vazios que podem acomodar os pares de elétrons doados pelos ligantes. O número de ligações coordenadas formadas depende, sobretudo, do número de orbitais vazios de energia adequada. A regra do número atômico efetivo (NAE) diz que quando se forma um complexo, há adição de ligantes até que o número de elétrons do átomo metálico central mais o número de elétrons cedidos pelos ligantes sejam iguais ao número de elétrons do gás nobre seguinte. Embora a regra do NAE possa prever corretamente o número de ligantes de um grande número de complexos, há um número considerável de exceções, nas quais o NAE não é o número de elétrons de um gás nobre. A tendência em adquirir a configuração do gás nobre é um fator importante, mas não uma condição necessária para a formação de um complexo, pois é necessária também a formação de uma estrutura simétrica qualquer que seja o número de elétrons envolvidos (AYALA, 2014). Compostos moleculares neutros ou ânions livres coordenam o átomo metálico em um sistema denominado esfera de coordenação, no qual o átomo metálico ocupa o centro geométrico da esfera com os grupos ligantes ocupando a periferia em um posicionamento ordenado de modo a produzir o arranjo

espacial mais estável (Figura 1). A conformação do arranjo espacial depende do nox do íon metálico, do nível da camada de valência e da natureza do ligante (MÜLLER, 2006).

O arranjo dos ligantes ao redor do íon central é influenciado também pelo tamanho do ligante, da natureza do ânion e em alguns casos do procedimento de síntese utilizado. Os principais fatores que influem na distribuição dos ligantes ao redor do átomo central são a repulsão mútua entre os ligantes e os impedimentos estéricos dos ligantes polidentados. Estes fatores revestem-se de importância especial devido à natureza da ligação átomo central-ligante. O poliedro de coordenação ao redor de um íon central pode ser estudado calculando-se a configuração de equilíbrio de qualquer número de partículas idênticas (átomos doadores) a uma mesma distância do íon central, ou seja, restritas a uma superfície esférica de raio unitário e interagindo com forças deriváveis de um potencial interpartículas, ou seja, a energia de repulsão ligante-ligante (AYALA, 2014).

Figura 1 - Arranjos espaciais mais comuns da esfera de coordenação metal-ligantes.



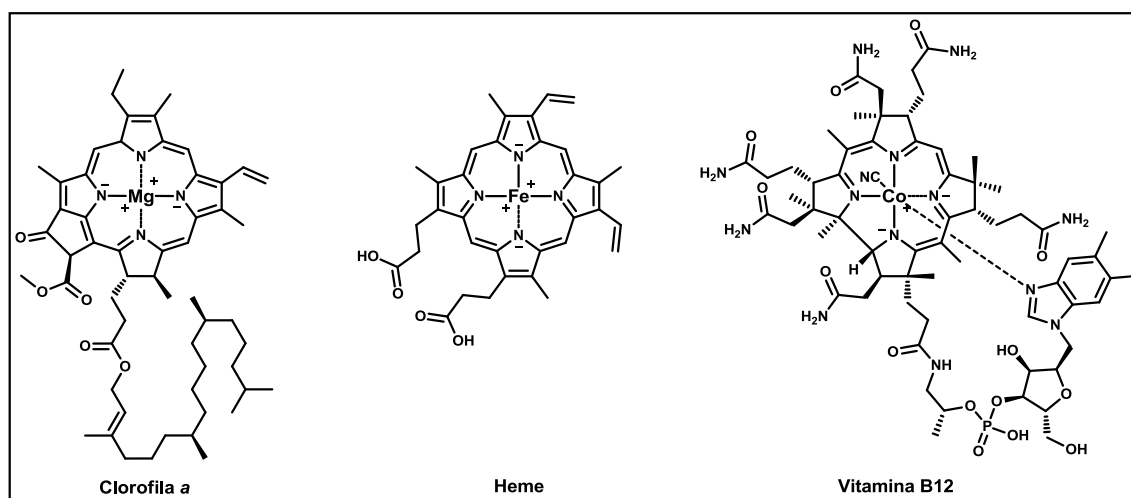
Fonte: Adaptado de MÜLLER, 2006.

3.1.1 As funções dos compostos de coordenação nos sistemas biológicos

Uma grande parcela de todos os metais existentes na litosfera ocorre na forma de minerais. Os minerais em sua maioria são complexos inorgânicos cristalinos geralmente compostos por óxidos, sulfetos, carbonatos e silicatos de metal oxidado (MÜLLER, 2006). À medida que ocorre a mobilização dos metais a partir dos minerais por lixiviação, os sistemas biológicos os assimilam como nutriente. Os metais são integrados aos sistemas biológicos, que os empregam na biossíntese de organocomplexos para o desempenho de funções metabólicas (ATKINS, 2012).

Os complexos com funções biológicas mais conhecidos são as moléculas de metal-porfirina (ZHANG & LASH, 2003). As clorofilas (Figura 2) compreendem os pigmentos fotossintetizantes dos seres autotróficos, com um centro reativo de magnésio II-porfirina (WOODWARD, 1960). As reações fotossintéticas de $\text{CO}_2 + \text{clorofila} + \text{H}_2\text{O}$ são catalisadas pela luz visível e produzem toda a reserva energética basal das cadeias alimentares, além de todo o O_2 atmosférico. Nos vertebrados ocorrem as metaloproteínas carreadoras hemoglobina e mioglobina, que são complexos de ferro II-porfirina responsáveis pelo transporte de O_2 às células e pela remoção do CO_2 produzido pela respiração (WEED et al., 1963). A cianocobalamina, ou vitamina B12 é uma enzima com o centro ativo composto por uma estrutura complexada de cobalto III-porfirina. Esta vitamina é produzida por microrganismos e transferida através da cadeia alimentar, sendo essencial para eritropoiese, ou seja, a produção de células sanguíneas na medula óssea de mamíferos (WICKRAMASINGHE, 1995).

Figura 2 - Principais biocomplexos metálicos derivados do grupo porfirina.



Fonte: Adaptado de WOODWARD, 1960.

A maior diversidade de elementos do bloco *d* com função biológica está nas metaloproteínas. Estas macromoléculas possuem ao menos um átomo metálico como cofator e possuem funções variadas que vão desde a transferência de elétrons para complexos enzimáticos vizinhos à atividade catalítica pura (MATSUMOTO & JASANOFF, 2013). O metal mais abundante das metaloproteínas é o ferro. O baixo potencial redox entre as espécies Fe (II) e Fe (III) (-0,77 V) (LIDE, 2003) é uma propriedade intrínseca deste elemento, a qual é responsável pela função de transferência eletrônica da rubredoxina (bactérias) (SANTOS et al., 2010) e da atividade redox dos citocromos. Por ser um nutriente de alta demanda para os

vertebrados, uma grande parcela do ferro é reciclado e armazenado na ferritina, uma metaloproteína responsável pela reserva de ferro no fígado, do qual disponibiliza para a síntese de hemoglobina e mioglobina (DUBIEL et al., 2014).

O cobre é outro elemento presente em metaloproteínas de transferência eletrônica. A plastocianina é um componente da cadeia de transferência de elétrons capturados pela clorofila na fotossíntese. A ligação do Cu (II) com átomos de enxofre de aminoácidos cisteína compreende o centro catalítico da plastocianina (FARKAS & HANSSON, 2011). Os animais possuem a ceruloplasmina como transportador sérico de Cu (II) metabolizado (VASSILIEV et al., 2005). O molibdênio está presente no centro catalítico de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio. A xantina oxidase, uma enzima ativa na oxidação de xantinas e purinas para produção do ácido úrico e ureia, no metabolismo do final do nitrogênio (SOKOLOVSKA et al., 2013).

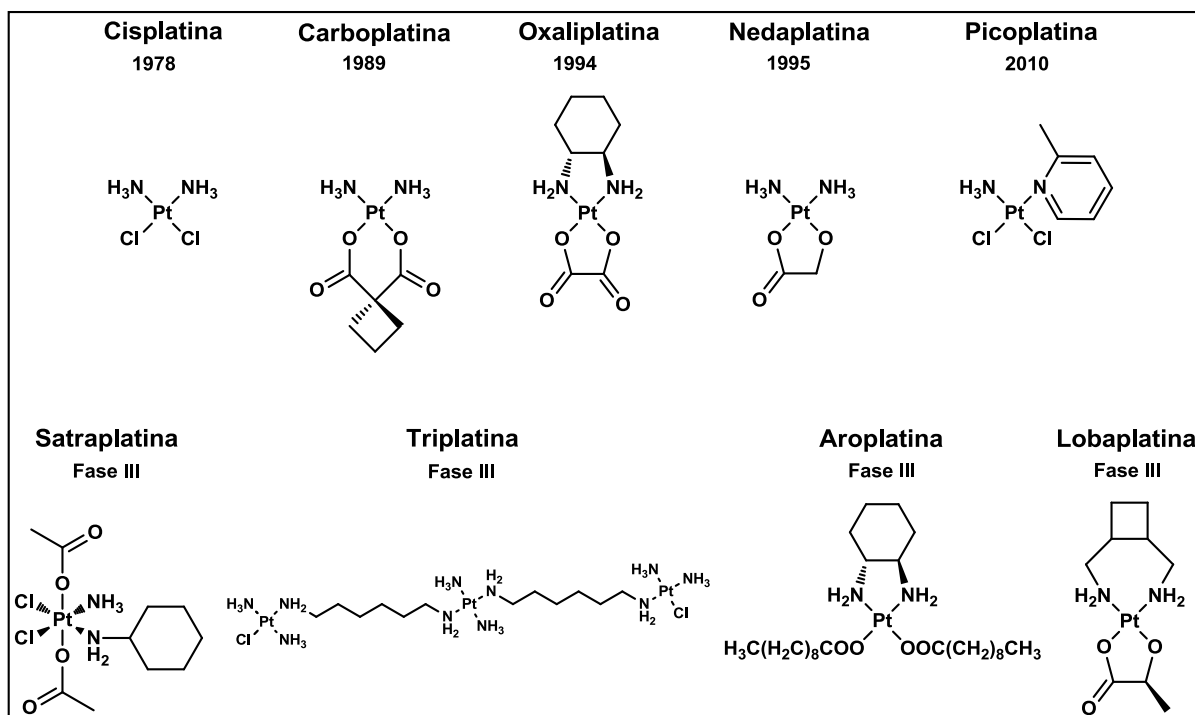
Outros elementos, como Zinco, Cobalto, Níquel, Cádmio, Manganês e Vanádio compreendem centros catalíticos de inúmeras metaloenzimas com atividade redox (MATSUMOTO & JASANOFF, 2013).

3.2 METAIS DE TRANSIÇÃO EM MEDICAMENTOS

No contexto histórico, a cisplatina (Cloreto de cis-diaminoplatina II) foi a primeira molécula puramente inorgânica a ser utilizada como fármaco no tratamento do câncer. Hoje, é um medicamento oncológico de primeira linha para o tratamento de câncer de ovário e esôfago. Seu mecanismo de ação ocorre por intercalação à α -hélice do DNA por complexação, geralmente às bases de guanina, induzindo às quebras duplas de cadeia e consequente apoptose da célula (LORUSSO et al., 2014). Após o advento da cisplatina em 1978, muitas pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de obterem-se novos complexos análogos à cisplatina para o tratamento de outros tipos de câncer. A Figura 3 destaca algumas moléculas derivadas da cisplatina, bem como o ano da aprovação do Food and Drug Administration (FDA) ou o estágio de desenvolvimento da pesquisa (MONNERET, 2011). A versatilidade química da cisplatina permite estudos variados, como no caso da Lipoplatina (cisplatina lipossomal), uma mistura derivatizada com 8,9% cisplatina e 91,1% de uma combinação de lipídios (dipalmitoil-fosfatidil-glicerol, cloridrato de soyfosfatidil-colesterol e metóxi-poliestilenoglicol-distreatoil-fosfatidil-etanolamina) com o intuito de melhorar a lipossolubilidade do fármaco no tratamento de tumores resistentes à cisplatina

(FROUDARAKIS et al., 2011). A lipoplatina encontra-se em fase I e II de desenvolvimento. O caso dos complexos da platina é um exemplo clássico de pesquisas de melhoramento de medicamentos conhecidos (KALUĐEROVIĆ et al., 2012).

Figura 3 - Complexos oncológicos derivados da platina e o ano de aprovação pelo FDA.



Fonte: Adaptado de MONNERET, (2011).

Hoje muitos compostos de coordenação são usados como suplementos dietético para reposição do nível basal de alguns metais considerados essenciais. O complexo repositivo de metal mais utilizado é o sulfato de ferro II heptahidratado para o tratamento da anemia tipo ferropriva, seja por casos de desnutrição ou por hemorragias. O gluconato de ferro II e o succinato de ferro II são também utilizados com o mesmo propósito (VIETH & LANE, 2014). Os complexos nicotinato de cromo III e picolinato de cromo III são suplementos alimentares do elemento-traço Cr (III) para tratamento dos sintomas de diabetes tipo II e hipoglicemia. O suplemento deste elemento produz efeitos positivos para o plasma, aumentando o nível das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e reduzindo os níveis de colesterol e triglicerídeos livres. Também induz ao incremento de massa corporal, sendo indicado apenas para praticantes de exercícios físicos regulares (BROADHURST et al., 1997).

Os complexos de vanádio têm sido objeto de pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do diabetes. Os primeiros relatos do uso de sais de vanádio IV com resultados positivos frente à diabetes datam do ano de 1899, porém após 100 anos

ainda não existe um fármaco comercial disponível (THOMPSON & ORVIG, 2006). As pesquisas atuais apresentam resultados positivos para alguns complexos de vanádio IV com atividade mimética à insulina, como o Bis(Maltolato)-Oxovanádio IV e o $(VO)_2$ -EDTA (BARBOSA, 2004). O desenvolvimento destes complexos representam alternativas à insulina e representam ganhos na qualidade de vida do paciente, uma vez que reduz-se o desconforto das aplicações injetáveis de insulina.

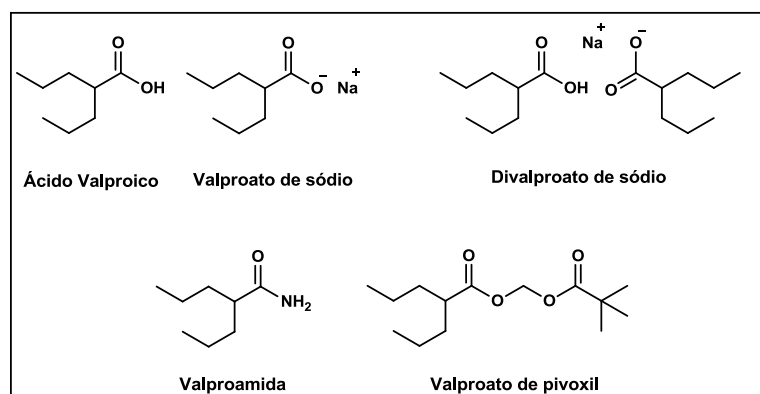
No âmbito dos antibióticos, a citotoxicidade dos metais pesados é bastante explorada. O principal exemplo é o Timerosal (Etil(2-mercaptopbenzoato-(2-)-O,S)mercurato (I) de sódio) um complexo organometálico de mercúrio que foi utilizado por muitos anos como princípio ativo do antisséptico Merthiolate[®] e como conservante de vacinas, patenteado em 1927. O Timerosal está em desuso em países desenvolvidos, porém ainda é muito usado como conservante de vacinas em países subdesenvolvidos por não possuírem sistemas de refrigeração que garanta a conservação (IDA-ETO et al., 2013).

Um campo de aplicação de complexos organometálicos é o uso como contraste para exames de diagnóstico de imagem. Muitas ferramentas avançadas de diagnóstico dependem de elementos metálicos com características especiais, contudo a forma mais eficiente para reduzir a toxicidade destes metais está na formação de complexos que reduzem a interação química do elemento. O complexo de Gadolínio (elemento terra-rara paramagnético da série dos lantanídeos) $Gd(DTPA).H_2O$ é muito utilizado em exames de Ressonância Magnética de imagem na forma de solução injetável intravenosa (ZHOU et al., 2012). A eventual toxicidade do elemento é mascarada pelo ligante DTPA, um quelante poli dentado que mantém o metal quimicamente isolado e permite a excreção sem metabolização (ZOLAL et al., 2012). Os exames de cintilografia usam os complexos de tecnécio 99 metaestável. O ^{99m}Tc é complexado a uma molécula característica do metabolismo do órgão a ser examinado e é administrado ao paciente. O complexo metálico inocula-se no órgão e o metal produz emissões de raios γ por decaimento nuclear, onde a densidade de emissões é capturada e traduzida como imagem. O complexo $^{99m}Tecnécio$ *Sestamibi* (Hexakis(2-metóxi-2-metilproplisonitrila) ^{99m}Tc) comercializado como Cardiolite[®] é utilizado na forma de solução intravenosa para exames de imagem do músculo cardíaco (MUJTABA et al., 2007).

3.3 ÁCIDO VALPROICO

O ácido valproico ou AVP (ácido 2-propil-pentanoico) é um fármaco amplamente usado para o tratamento de convulsões parciais e generalizadas em pacientes epilépticos. Sua descoberta em 1963 deu-se por acaso quando era usado como veículo para outros compostos rastreados para atividade anticonvulsivante. O uso como medicamento foi liberado nos Estados Unidos da América em 1978 com o nome comercial Depakene[®], sendo produzido pela Abbott Laboratories (ABBOTT, 2009). O mecanismo de ação deste fármaco está, principalmente, na potencialização da atividade dos neurotransmissores GABA (WINTERER, 2003), seja por aumento da biossíntese do neurotransmissor ou pela inibição da degradação. Outro mecanismo importante é a ativação prolongada dos canais de sódio voltagem-dependentes, o qual limita a deflagração de correntes elétricas em neurônios específicos. O AVP é muito eficaz no tratamento da epilepsia, do distúrbio bipolar, enxaqueca e crises de ausência em crianças e adolescentes (GILMAN, 2012). Após o advento do AVP, vários análogos (bioisómeros) foram desenvolvidos pela Abbott Laboratories e são fármacos comerciais (MARTINDALE, 2009), representados na Figura 4.

Figura 4 - Ácido valproico e seus derivados comerciais desenvolvidos pela Abbott Laboratories.

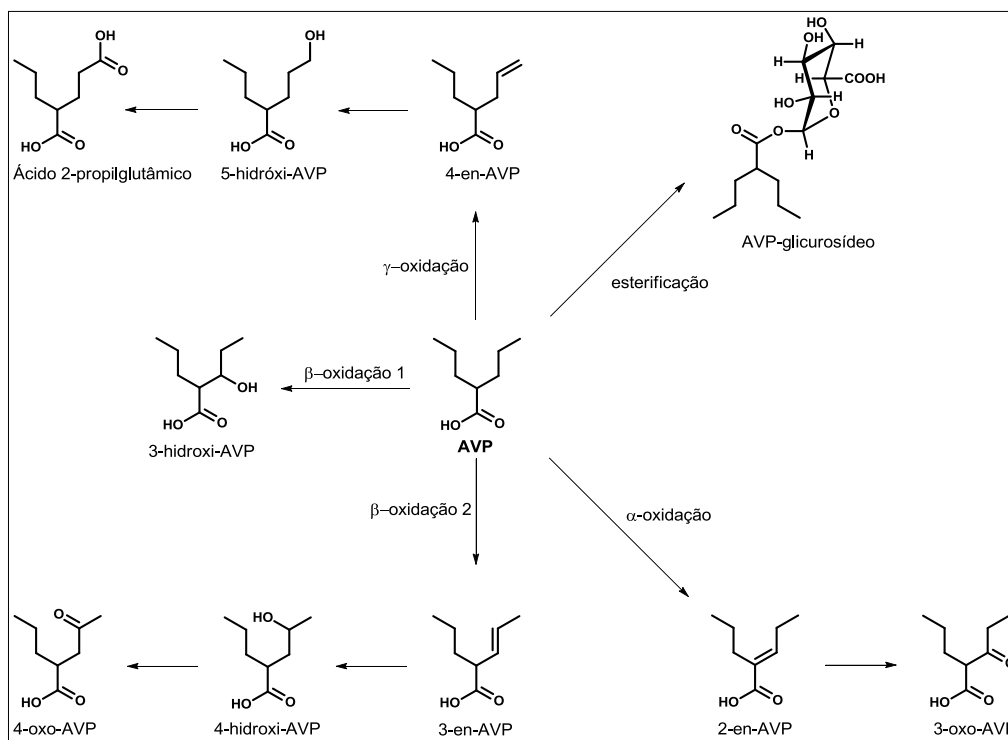


Fonte: MARTINDALE, (2009).

O AVP oralmente administrado é rapidamente absorvido. Este é transportado ligado às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, restando um pequeno volume para distribuição. A metabolização ocorre inicialmente no fígado, porém uma pequena parcela é excretada sem metabolização (NURGE et al., 1991). Atualmente, mais de dez metabólitos de AVP foram identificados e classificados de acordo com sua rota metabólica, porém nem todos os metabólitos são identificados por serem ligados às vias de biotransformação específicas. As

rotas identificadas (Figura 5) incluem alfa-esterificação do ácido glicurônico, beta-oxidação e gama-oxidação 1 e 2 e γ - oxidação via sistema citocromo P-450.

Figura 5 - Principais rotas de biotransformação do AVP e seus metabólitos.



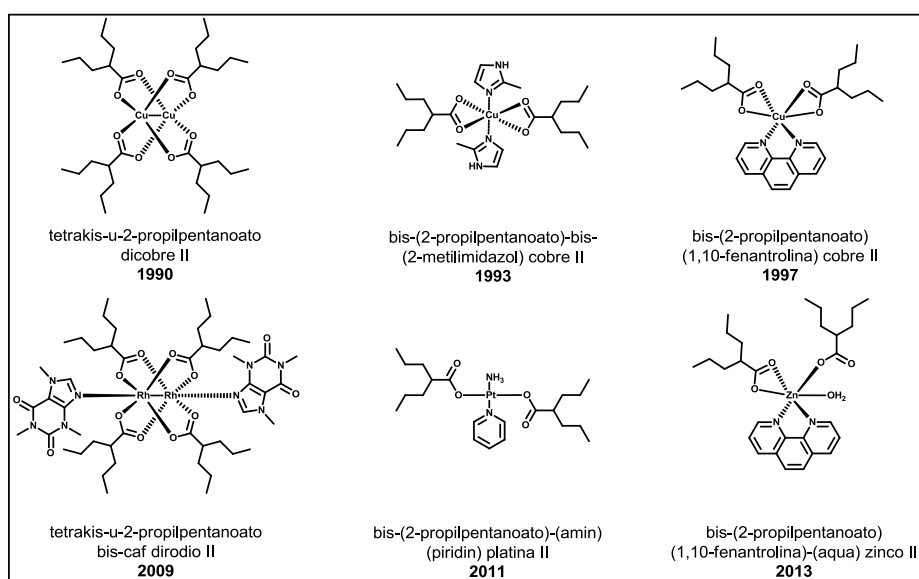
Fonte: Adaptado de NURGE et al.,(1991) e BELLO-RAMÍREZ et al., (2002).

Os metabólitos 4-en-AVP (ácido 2-propil-4-pentenoico) e 2-en-AVP (ácido 2-propil-2-pentenoico) possuem atividade anticonvulsivante quase tão potente quanto a substância parental, porém apenas o metabólito 2-en-AVP acumula-se no cérebro (BELLO-RAMÍREZ et al., 2002). O metabólito 4-en-AVP proveniente da rota de γ -oxidação apresenta a maior toxicidade (GILMAN; 2012) (GOFFLOT et al., 1995). Os metabólitos mais abundantes no plasma humano são o 2-em-AVP e 3-oxo-AVP, os quais sugerem que a α -oxidação seja a principal via de biotransformação do AVP. As vias de β -oxidação e γ -oxidação atuam na biotransformação de pequenas quantidades de AVP. Inicialmente o AVP é metabolizado na via de glicuronidação (esterificação), que pode variar de 7% a 80% da dosagem administrada. Alguns fatores como genética, dieta e co-medicação são citados como interferentes nas vias de biotransformação do AVP (NURGE et al., 1991). A alta atividade de biotransformação demanda altas doses diárias (dose inicial de $15 \text{ mg kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ e pode progredir até o limite máximo de $60 \text{ mg kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$) o que pode produzir efeitos colaterais decorrentes da toxicidade ao trato gastrointestinal, pâncreas, fígado e no sistema endócrino (MARTINDALE, 2009). O AVP é um potente inibidor de histona desacetilases (HDAC), um grupo de enzimas

responsáveis pela deacetilação de histonas (YAMAUCHI et al., 2011). As HDAC estão ligadas aos processos de transcrição do DNA para a expressão gênica. A acetilação que ocorre normalmente em uma célula neutraliza as cargas positivas na histona por transformar aminas em amidas e diminuir a habilidade das histonas em ligarem-se ao DNA (GIANNINI et al., 2009). As propriedades inibidoras de HDACs interferem diretamente no metabolismo de replicação celular apresentam um potencial farmacológico do AVP ainda pouco explorado (GRIF et al., 2011).

A molécula do AVP pode ser derivatizada por reações químicas com o grupo carboxilato para a produção de moléculas com atividades farmacológicas alteradas pelo conceito do bioisosterismo (LIMA & BARREIRO, 2005). A derivatização por complexação é bastante aplicada em pesquisa e desenvolvimento de moléculas bioativas, sendo aplicável ao AVP. O ânion valproato reage com cátions bivalentes de metais alcalinos terrosos e metais de transição como magnésio, cálcio, manganês, cobalto, cobre e zinco para produzir sais pouco solúveis em água (ABUHIJLEH & WOODS, 1993). Os íons bivalentes de metais mais pesados como platina e ródio também são compatíveis com o íon valproato (GRIF et al., 2011) (ABUHIJLEH et al., 2009). Os sais metálicos de valproato apresentam grande versatilidade química, pois podem ser coordenados com uma gama de ligantes neutros diferentes para se obter sais complexos com propriedades químicas e farmacológicas intrínsecas (VEITÍA et al., 2009). A Figura 6 ilustra alguns derivados do AVP produzidos por complexação com metais de transição nas últimas duas décadas.

Figura 6 - Complexos metálicos do AVP.



Fonte: Adaptado de HADJIKOSTAS et al., (1990), ABUHIJLEH & WOODS, (1993), ABUHIJLEH, (1997), ABUHIJLEH et al., (2009), GRIF et al., (2011), ABU et al., (2013).

3.4 COBRE

O cobre é classificado como metal de transição que pode ocorrer naturalmente na forma elementar como metal livre. Existem dois isótopos naturais estáveis: ^{63}Cu (69,17%) e ^{65}Cu (30,83%), o que dá ao cobre a massa atômica média de 63,546 Daltons (LIDE, 2003). As espécies oxidadas Cu^+ e Cu^{+2} são predominantes para aplicações como reagente em química e para funções metabólicas nos sistemas biológicos. É classificado como um ácido de Lewis forte e coordena-se fortemente com bases de Lewis fortes, como óxido, sulfeto e bases nitrogenadas (ATKINS, 2012). O cobre está presente em toda a biosfera, sendo assimilado por quase todos os seres vivos como um elemento-traço essencial. Em humanos adultos, a concentração média de cobre é de $1,03 \text{ mg Kg}^{-1}$ (LIDE, 2003).

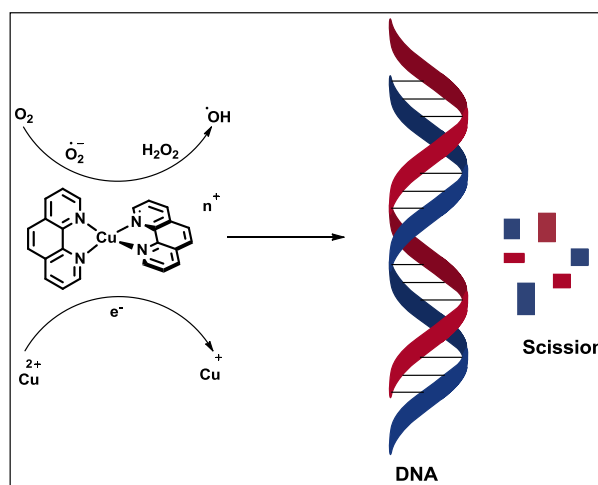
A presença do cobre é essencial para uma gama de complexos enzimáticos intracelulares que atuam em biossíntese de metabólitos e no rearranjo radicalar, geralmente envolvendo a interconversão redox entre as espécies cobre I e cobre II. As lacases são enzimas cobre-dependentes do grupo das oxidases, as quais são produzidas por fungos para degradação oxidativa da lignina dos vegetais mortos (WANG et al., 2014), sendo enzimas essenciais na reciclagem e mineralização da matéria orgânica. As enzimas do citocromo c oxidase ou complexo IV da cadeia respiratória presentes nas mitocôndrias possuem núcleos de cobre e ferro, as quais promovem as reações redox de captura do H^+ pelo O_2 e levando à formação de água na última etapa da cadeia respiratória (ASHE et al., 2014). Em artrópodes e moluscos, o cobre tem função transportadora de oxigênio no sistema respiratório. O complexo di-cobre-histidina é o sítio ativo da hemocianina, o complexo proteico presente na hemolinfa destes animais com característica e função análogas à hemoglobina de ferro-porfirina dos vertebrados (COATES & NAIRN, 2014). O complexo $\text{Cu-O}_2\text{-Cu}$ da hemocianina tem coloração fortemente azulada, razão pela qual alguns artrópodes possuem sangue azul (COATES et al., 2012). O grupo polifenol oxidase (PPO ou tirosinases) são enzimas redox de cobre que participam da biossíntese dos polifenóis da melanina, pigmentos fotoprotetores da pele, olhos, escamas, penas e pelos dos vertebrados superiores (UCHIDA et al., 2014). Deficiências genéticas na biossíntese das PPOs levam à despigmentação conhecida como albinismo. Complexos enzimáticos redox do grupo superóxido dismutase (Sod) possuem o cobre, assim como outros metais como cofator. O citosol das células eucarióticas contém a enzima Cu-Zn-Sod como dismutador do radical ânion superóxido produzido pela respiração, levando-o a peróxido (SANDALIO et al., 1992). Os grupos de enzimas superóxido dismutase

(Sod) e catalase (Cat) possuem caráter protetivo à célula ao depreciar espécies reativas de oxigênio (EROs) danosas ao DNA.

O suprimento de cobre é obtido com alimentos variados, como legumes (feijão) e grãos. À medida que o cobre é absorvido pelo trato gastrointestinal, liga-se à albumina e é transportado até o fígado onde é metabolizado. Após a metabolização o cobre é distribuído para outras partes do corpo por via sérica carregado pela proteína ceruloplasmina (MENÉNDEZ et al., 2014). A ceruloplasmina também transporta o cobre para as glândulas mamárias, onde este é excretado na proteína láctea como nutriente para os lactantes. O cobre fica na circulação entero-hepática a uma taxa de $5,0 \text{ mg dia}^{-1}$, contra $1,0 \text{ mg dia}^{-1}$ que é absorvido na alimentação. Logo, o corpo é capaz de excretar o excesso de cobre por secreção biliar no intestino (VASSILIEV et al., 2005).

A deficiência de cobre pode levar a quadros de anemia, pelo fato de ser um cofator na absorção do ferro. Também produz quadros de neutropenia (baixos níveis de neutrófilos), anormalidades ósseas, depressão do sistema imunitário, comprometimento do crescimento, osteoporose, hipertireoidismo e anormalidades no metabolismo do colesterol e da glicose (NAKAGAWA et al., 2014). O acúmulo de cobre no fígado e no cérebro leva a doença de Wilson ou degeneração hepatolenticular. A doença é ocasionada por uma desordem genética autossomal recessiva, o que ocasiona acúmulo de cobre no fígado e no cérebro (PATIL et al., 2013). A doença de Wilson manifesta-se na forma de desordens neurológicas e cirrose hepática. A profilaxia de primeira linha é a administração oral de agentes complexantes específicos, como a D-penicilamina e trientina (WEISS et al., 2013). Muitos casos de cirrose levam à deterioração do fígado havendo necessidade de transplante do órgão. A doença de Alzheimer está associada com concentrações elevadas de cobre no cérebro (HUREAU & FALLER, 2009). A degeneração neurológica presente nesta doença está associada ao aumento de EROs (Figura 7) no interior das células nervosas, os quais ocasionam danos oxidativos ao DNA e consequente morte celular. O cobre II é uma espécie oxidante e potencializa a produção de EROs (KELLETT et al., 2012).

Figura 7 - Geração de EROs e o dano causado ao DNA por complexo de cobre.



Fonte: KELLETT et al., 2012.

Alimentação com níveis reduzidos de cobre podem ser usadas como estratégia na prevenção da doença de Alzheimer (SQUITTI et al., 2014).

3.5 ZINCO

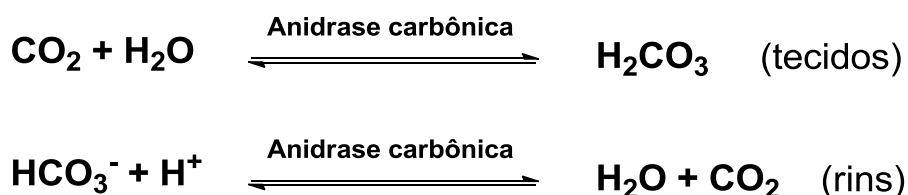
O zinco é classificado como metal de transição e ocorre naturalmente na forma oxidada Zn^{+2} . Existem cinco isótopos naturais estáveis: ^{64}Zn (48,63%), ^{66}Zn (27,90%), ^{67}Zn (4,10%), ^{68}Zn (18,75%) e ^{70}Zn (0,62%) o que dá ao zinco a massa atômica média de 65,409 Da (LIDE, 2003). A espécie oxidada Zn^{+2} é predominante tanto as para funções metabólicas nos sistemas biológicos como para aplicações como reagente em química. Assim como o cobre, o zinco é um ácido de Lewis forte e liga-se fortemente com bases de Lewis fortes, como óxido, sulfeto e bases nitrogenadas (ATKINS, 2012). Este elemento possui características químicas que o tornam altamente suscetível à formação de complexos com até seis ligantes diferentes.

O zinco é um elemento dietético essencial para os animais. A concentração média de zinco em humanos adultos é de 32,86 mg Kg^{-1} , colocando-o como o segundo metal de transição mais abundante, inferior apenas ao ferro, que representa 60 mg Kg^{-1} (LIDE, 2003).

Após o cobre, o zinco é o ácido de Lewis intracelular mais forte, coordenando-se principalmente a grupos tióis de cisteína e resíduos nitrogenados de imidazol em proteínas (BLENCOWE; MORBY, 2003). O Zn^{+2} é um dos íons mais importantes para os sistemas biológicos sendo essencial para a atividade de mais de 300 enzimas presentes em mais de 50

reações celulares (HIJAZI et al., 2013). As anidrases carbônicas são metaloenzimas de zinco presentes nos músculos, sangue, fígado, rins e secreções dos mamíferos. A função básica deste grupo de enzimas é regular a concentração de prótons (acidez) do citosol, mitocôndrias, membranas celulares e fluidos pela captura de prótons via reação de equilíbrio ácido-base (STILLEBROER et al., 2010). A reação de equilíbrio (Figura 8) entre o ácido carbônico, o bicarbonato e o dióxido de carbono na presença de água é controlada pela anidrase carbônica para manter o pH do meio equilibrado.

Figura 8 - Reação de equilíbrio controlada pela anidrase carbônica.



As carboxipeptidases são metaloenzimas de zinco com função de hidrólise proteica com ação nos terminais carboxilatos do peptídeo. Estão presentes no trato gastrointestinal para digestão da proteína do alimento e também no citosol para o catabolismo proteico. Estas reações catalíticas são utilizadas pela célula como fator de crescimento (mudança de fase G0 para G1) e na biossíntese de peptídeos de função hormonal, como a insulina (JAUREGUI et al., 1988). Nos demais casos, o Zn (II) atua como cofator para ativação enzimática.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO

3.6.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de IV está baseada no fato das moléculas orgânicas absorverem radiações nos comprimentos de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} e converter esta energia em movimentos rotacionais e de estiramento das ligações químicas. O processo de absorção é quantizado e, em consequência, o espectro de absorção das moléculas consiste em uma série de linhas (SILVERSTEIN, 1998). As linhas acumuladas caracterizam bandas de absorção características de cada tipo de ligação. Portanto, grupos funcionais diferentes apresentam bandas de absorção características. Em geral, uma escala linear de número de onda é preferida em IV por causa da proporcionalidade direta entre esta grandeza e energia de frequência. A

frequência da radiação absorvida é, por sua vez, a frequência da vibração molecular realmente responsável pelo processo de absorção (SKOOG, 2000). A intensidade das bandas pode ser expressa como transmitância ou absorbância. A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide.

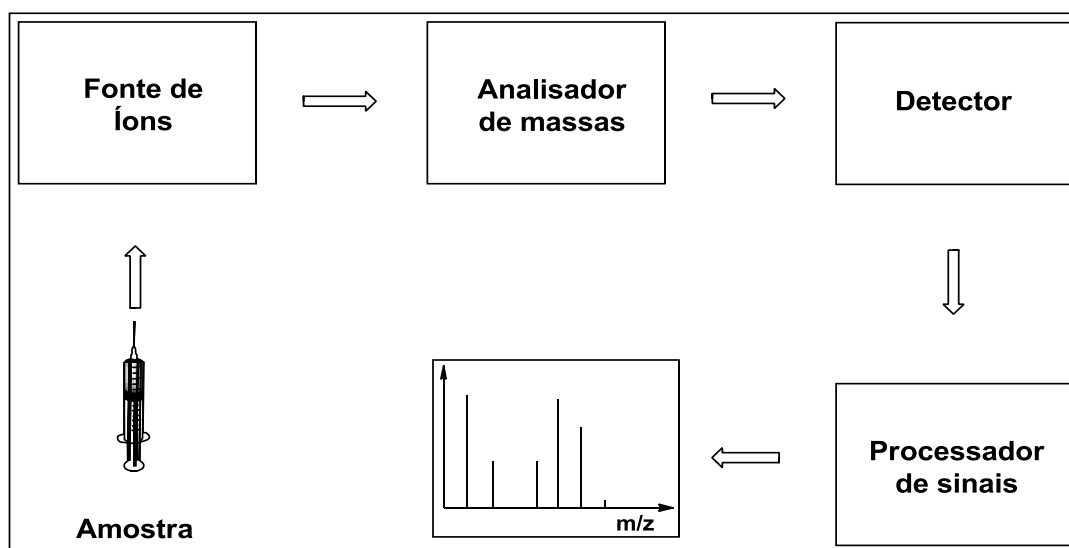
A identificação da estrutura molecular de compostos desconhecidos por espectroscopia de IV é difícil, visto que as bandas de absorção apresentam apenas os grupos funcionais da estrutura. A intensidade das bandas dá uma estimativa do grau de substituição química da estrutura. Para se obter um espectro com maior resolução é necessário que a amostra esteja com elevado grau de pureza, e pode ser analisada nos três estados físicos (SILVERSTEIN, 1998).

O funcionamento do espectrômetro de IV é relativamente simples. A fonte de radiação, geralmente composta por um transdutor laser emite os comprimentos de onda para filtros e transmitido para o compartimento da amostra. A energia não absorvida é direcionada ao detector, que mede a intensidade de absorção para cada unidade de comprimento de onda da radiação (SKOOG, 2000). Espectrômetros modernos utilizam a Transformada de Fourier como ferramenta matemática para obtenção do espectro. A espectroscopia FTIR está baseada na ideia de que a radiofrequência entre dois sensores produz um interferograma. A resposta é um sinal produzido em função da mudança do caminho da radiação entre ambos os sensores. Os dois domínios de distância e frequência são interconvertidos pelo método matemático de Transformada de Fourier (STUART, 2004). Esta configuração instrumental elimina a necessidade do uso de um divisor de feixe para correção do branco. Assim, o espectro é obtido diretamente e unicamente da amostra.

3.6.2 Espectrometria de Massas por Tempo de Voo

De modo geral todos os espectrômetros de massas possuem uma configuração básica, como apresentado na Figura 9. A variação entre as configurações reside basicamente no analisador, onde existem muitas configurações com princípios físicos muito diferentes. As variações implicam basicamente no intervalo de massas a ser analisado (m/z) e na resolução dos sinais. Dentre os analisadores de massas comerciais, destacam-se as configurações com filtro de Massas por Tempo de Voo (TOF).

Figura 9 - Esquema dos elementos básicos de um espectrômetro de massas.



Fonte: SKOOG, 2008.

Nos espectrômetros de massas por Tempo de Voo (TOF), todas as partículas de carga unitária submetidas à uma diferença de potencial V atingem a mesma energia translacional em elétron-volt (eV). Assim, as partículas mais leves têm tempos de voo menor para a mesma distância. As partículas aceleradas passam por uma região onde o campo não atua, são separadas no tempo através de seus valores de m/z e coletadas (SILVERSTEIN, 1998).

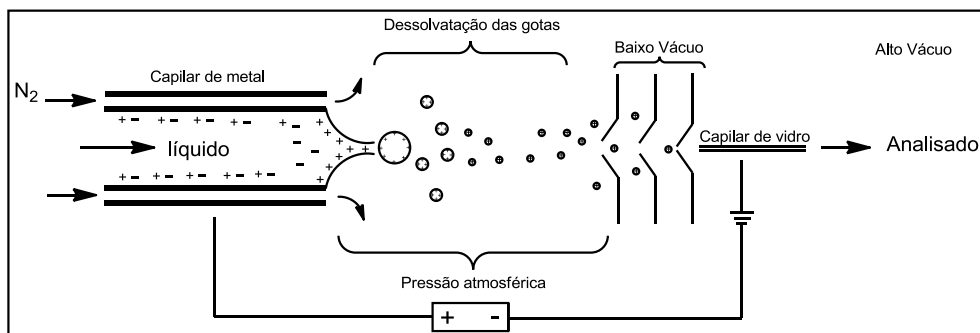
Os espectrômetros TOF modernos possuem configurações mistas com outros filtros de massas, como os quadropolos (BRUKER DALTONICS INC, 2012). Tais configurações produzem os instrumentos TOF de alta resolução com janela espectral ampla, o qual pode analisar desde pequenas moléculas (50 Da) até proteínas (20.000 Da) oriundas dos mais diversos tipos de fontes de íons. As configurações mistas aliadas às fontes de íons mais modernas, como ESI e MALDI, proporcionaram avanços tecnológicos significativos na TOF-MS. Nos últimos anos, a instrumentação TOF-MS é utilizada como ferramenta de diagnóstico em microbiologia clínica, virologia, proteômica e caracterização de metabólitos em tecidos biológicos com grandes vantagens sobre os métodos clássicos (MURRAY, 2010)(PASSARELLI & WINOGRAD, 2011).

3.6.2.1 Fonte de Electrospray (ESI)

O “electrospray” (Figura 10) foi sugerido como um possível modo de ionização para espectrometria de massas por Dole em 1968. Embora seja normalmente considerada como

uma fonte de ionização, o “electrospray” é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa (MORAES & LAGO, 2003).

Figura 10 - Esquema básico da fonte ESI operando em modo íons positivos.



Fonte: Adaptado de CARLTON & SCHUG (2011)

ESI-MS é de particular interesse para a análise de complexo de metal em decorrência da transição suave a partir da solução para a fase gasosa, que mantém a especiação da fase de solução para a extensão da fase gasosa. O processo de ionização geralmente leva à espécies individualmente carregadas, o qual resulta em espectros de massas simples com picos de m/z que se relacionam diretamente com as espécies em solução ou como adutos destas espécies (KEITH-ROACH, 2010). A ESI é uma fonte de baixa energia de ionização configurada para obterem-se íons moleculares e espectros com baixa fragmentação. Contudo esta configuração é ótima apenas para análise de compostos polares (bases orgânicas de Lewis e ácidos orgânicos de Lewis) facilmente ionizáveis por dissociação ou por formação de adutos para a produção de cátions ou ânions. As reações para a formação de íons em fase gasosa podem ocorrer de forma espontânea como a ionização de sais e dissociação de ácidos, ou, como na maioria das moléculas orgânica polares, faz-se necessário a configuração do meio líquido para induzir a formação de cargas (VEENSTRA, 1999). Compostos de caráter básico (aminas, ésteres, aminoácidos) são ionizáveis pela indução de formação de adutos com ácidos de Lewis adicionados ao meio, como ácidos orgânicos fortes de baixa massa e sais inorgânicos de sódio e potássio. Compostos de caráter ácido (ácidos carboxílicos, fenóis) são ionizáveis por desprotonação induzida pela adição de bases de Lewis ao meio, como hidróxidos voláteis (hidróxido de amônio). Compostos de coordenação com metais são facilmente ionizáveis por dissociação e não necessitam de indução química do meio. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário. De qualquer forma, é fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons de uma solução para a fase gasosa para análise por espectrometria de massas, em tão pouco tempo, teve um impulso tão grande: talvez isto se deva ao fato da

maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorrerem em fase líquida, envolvendo muitas vezes espécies pouco voláteis (CARLTON & SCHUG, 2011).

A fase gasosa é um ambiente ideal para o estudo da reatividade intrínseca de moléculas livres de solvente e contra-íons, sendo que a espectrometria de massas de múltiplos estágios é indicada particularmente para tais estudos, pois permite que os íons formados tenham suas relações massa/carga (m/z) selecionadas e, além disso, permite que reações sejam induzidas em ambientes com condições controladas, processo conhecido como reação íon/molécula. Muitos intermediários de reações são instáveis em solução, mas possuem algum tempo de vida na fase gasosa e, portanto, podem ser selecionados e suas reatividades intrínsecas estudadas (DINIZ, 2011).

3.6.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN mede a absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência entre 4 e 750 MHz, limites que correspondem a 75 e 0,4 m. Ao contrário da absorção no IV e no UV-Vis, neste tipo de espectroscopia o núcleo dos átomos, e não os elétrons, estão envolvidos no processo de absorção de energia. Para que os núcleos absorvam radiação é necessário expor a amostra a um campo magnético potente e homogêneo de vários tesla (T), o que leva os núcleos de interesse aos estados de energia necessários para que ocorra a absorção (SKOOG, 2000).

Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades. Os dois núcleos mais utilizados para estudos de moléculas orgânicas são o ^1H e ^{13}C , que possuem número quântico spin nuclear $\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. Núcleos de deutério e ^{12}C possuem spin 1 inteiro e são inativos em RMN. O deslocamento químico ocorre em razão de que os núcleos estão associados aos elétrons dos átomos e moléculas. Quando se aplica um campo magnético sobre uma molécula, a nuvem de elétrons que envolvem o núcleo tende a produzir um campo magnético em oposição ao aplicado. Deste modo o campo magnético dos elétrons em movimento tende a blindar o núcleo do campo externo. Esta blindagem define o deslocamento químico de cada núcleo irradiado e em razão da densidade eletrônica que o cerca. Como os grupos funcionais possuem densidades eletrônicas características, a posição espectral do sinal também será característica (SILVERSTEIN, 1998).

A instrumentação da RMN possui um poderoso gerador de campo magnético composto por bobinas de material supercondutor resfriado por He e N_2 líquidos. A cela de

amostra é localizada dentro de uma bobina de indução, a qual recebe pulsos elétricos em intervalos de tempo e intensidades definidas. As radiofrequências emitidas pela relaxação dos núcleos são captadas pelo detector. Um poderoso sistema eletrônico amplifica o sinal e o envia ao registrador, que apresenta o resultado na forma de um espectro (SILVERSTEIN, 1998). No processo de aquisição do espectro de ^1H ou ^{13}C , a amostra deverá ser dissolvida em solvente deuterado para que este não absorva as radiofrequências. Em geral usa-se DCCl_3 , piridina D_6 , metanol D_4 e DMSO D_6 para análises de núcleos de ^1H e ^{13}C .

Análises de RMN de amostras contendo metais de transição são especialmente limitadas. No geral, os metais dos blocos *d* e *f* da tabela periódica formam espécies com *nox* variado e geralmente são paramagnéticos (RICCO et al., 2014). Átomos paramagnéticos possuem elétrons desemparelhados na camada de valência que reagem ao campo magnético induzido pela bobina de radiofrequência e interferem no tempo de relaxação dos spins dos núcleos analisados. Portanto moléculas orgânicas ligadas com espécies metálicas diamagnéticas como Cu (I), Co (III), Zn (II) e Ag (I) poderão ser analisadas por RMN sem interferência no tempo de relaxação do núcleo em análise. Estas limitações dificultam a identificação de estruturas quaternárias de metaloproteínas e de enzimas que possuem centros catalíticos com metais pela RMN (KROCZEWSKA et al., 2002).

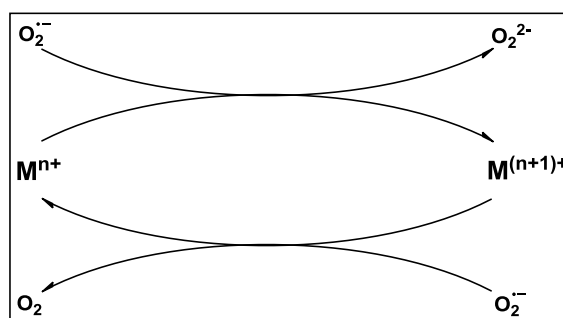
Complexos metálicos contendo zinco são bastante estudados por RMN em diversas áreas do conhecimento. OUARI et al., (2014) elucidaram as estruturas tridimensionais de complexos tetraédricos de Zn (II) produzidos por complexação com bases de Schiff por ^1H RMN e ^{13}C RMN, para produção de catalisadores. JENKINS et al., (2012) analisaram a estrutura do copolímero polietileno-ácido acrílico neutralizado com zinco por ^{13}C RMN no estado sólido e correlacionaram com as propriedades físicas do polímero. JASIEWICZ & BOCZOŃ (2005) avaliaram a influência da presença de Zn (II) complexado com alcaloides esparteína, α -isoesparteína e 2-metilesparteína (alcaloides *N, N'*- ligantes) no deslocamento químico para os sinais de ^1H e ^{13}C quando comparados aos sais análogos de perclorato. Em todos os casos, a presença do zinco produziu diferenças mínimas nos deslocamentos químicos dos núcleos em estudo, quando comparados aos sais de perclorato. ABU et al., (2013) avaliaram as estruturas de três complexos de Zn (II) com ácido valproico e os ligantes *N, N'* aromáticos 1,10-fenatrolina e 2-aminoetilpiridina para produção de protótipos de uma nova classe de fármacos antiepilépticos baseados na atividade neurológica do ácido valproico.

3.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE REDOX

3.7.1 Atividade SOD-like

O ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado por reações catalisadas por enzima durante processos metabólicos em sistemas vivos. O superóxido é a ERO mais reativa, a qual induz à danos no genoma quando a célula está em situação de estresse oxidativo. Normalmente as enzimas superóxido dismutase nativa (SOD) aceleram a dismutação de superóxido de acordo com o ciclo catalítico mostrado na Figura 11, com as taxas de dismutação próximas do limite de controle de difusão. Isto fornece defesa suficiente contra o radical superóxido (PAP et al., 2011) e mantém a célula com o metabolismo estável. As SODs são metaloproteínas com átomos metálicos de Cu^{+2} e Mn^{+2} como centros catalíticos.

Figura 11 - Esquema do fluxo eletrônico na atividade da SOD.



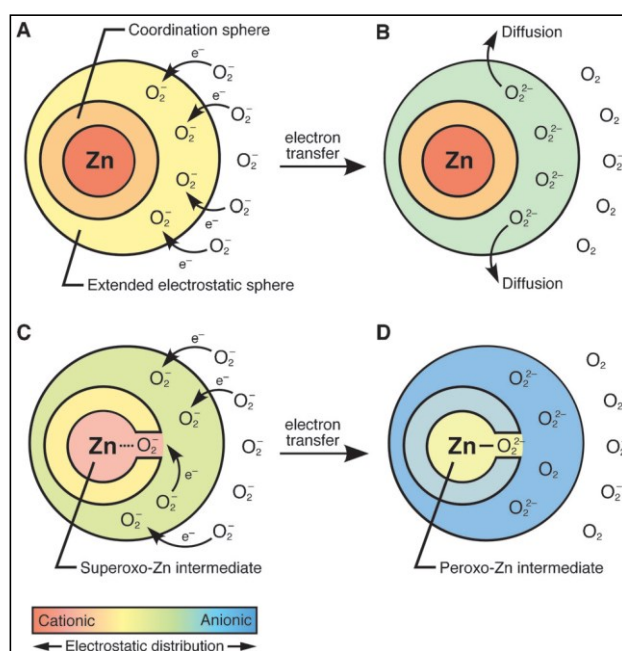
Fonte: Adaptado de PAP et al., (2011).

A atividade SOD-like compreende reações semelhantes à SOD atribuídas à moléculas de natureza não-enzimáticas. Muitos complexos de Cu (II) apresentam efeito citoprotetor positivo, incluindo os complexos que contêm 6-benzilamino-purina. Derivados de purina como ligantes são conhecido por atuar contra o stress oxidativo (KLANICOVÁ et al., 2012) e apresentam atividade citoprotetora *in vitro*. Complexos de Fe (II) com adenina são capazes de mimetizar a atividade de SOD, a qual é favorecida pela variação reversível do nox ferro entre as espécies Fe (II) e Fe (III) (KRIPLI et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por PAP et al., (2011) com complexos de purina com Mn (II) e Ni (II), o que indica que a atividade de SOD-like depende também da natureza do ligante além do nox do metal. ABUHIJLEH, (1997) apresentou os resultados de um estudo de avaliação da atividade SOD-like para um conjunto de complexos de Cu (II) com ligantes aromáticos neutros (*1,10-Phen*, *2,2-Bipy* e *4,4-Bipy*), ácido valproico e ácido salicílico. Os resultados mostraram maior atividade SOD-like para os exemplares com salicilato em detrimento aos exemplares com

ligantes neutros. CAO et al., (1999) avaliaram a atividade SOD-like de uma série de complexos de Cu (II) com tiosemicarbazonas com bons resultados quando comparados à atividade da enzima SOD *in vitro*.

O mecanismo das reações redox dos complexos miméticos da SOD foi proposto por WADA et al., (2013). Neste sistema, cátions de Zn (II) ligados com 2,2-bipy compõem um sistema redox capaz de atrair O_2 molecular e produzir radicais superóxido, como mostrado abaixo.

Figura 12 - Mecanismo de dismutação do radical-ânion superóxido por Zn (II).



Fonte: WADA et al., (2013).

3.7.2 Atividade CAT-like

As Catalases são enzimas que atuam em conjunto com as SODs para depreciação de ROS intracelular. A atividade catalítica da CAT consiste em uma reação redox de conversão do peróxido de hidrogênio à O_2 molecular e água de acordo com a equação química abaixo:



Esta reação protetora previne a célula do estresse oxidativo causado pelo radical hidroxil ($\cdot OH$) oriundo do peróxido de hidrogênio (MARTINS & ENGLISH, 2014). O centro catalítico das CAT consiste de um grupo ferro-porfirina (hemo) que atua em conjunto com os aminoácidos Histidina e Asparagina em um mecanismo redox muito similar à reação de Fenton (DÍAZ et al., 2012).

Uma variedade de compostos de coordenação com diferentes metais apresenta atividade mimética à catalase. KAR et al., (2013) reportam atividades *CAT-like* expressivas para uma série de complexos de Mn (II) octaédricos com ligantes derivados da piridina. Resultados similares foram reportados por PIRES et al., (2013) com um ensaio realizado com complexos polinucleares de Fe (II). Complexos de Cu (II) com dissulfetos orgânicos também apresentaram boas atividades SOD-like e *CAT-like* em um estudo descrito por ALIAGA et al., (2013). A derivatização da enzima catalase com nano partículas de dióxido de titânio pode ser uma maneira de obter-se compostos antioxidantes estáveis. Estas partículas, quando ligadas covalentemente à estrutura molecular da enzima potencializam a decomposição do peróxido de hidrogênio por efeito sinérgico, segundo estudo apresentado por ZHANG et al., (2014).

3.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS DE CITOTOXICIDADE

3.8.1 *Artemia salina*

A. salina é um invertebrado da ordem *Crustácea* (Figura 13) que ocorrem em ambientes aquáticos salinos das regiões tropicais (JAYASEKARA et al., 1986). Este organismo apresenta tolerância extrema às variações de salinidade do meio aquático, ocorrendo em lagunas salobras, mares e lagos altamente salino. É um elo na fauna destes ambientes, no qual é um núcleo no fluxo energético da cadeia alimentar. Em condições adversas (períodos de seca e alta salinidade) a *A. salina* reproduz-se produzindo ovos de casca grossa na forma de cistos. Os cistos desidratados permanecem dormentes por vários anos em ambiente seco, mantendo o embrião em estado completamente ametabólico. O metabolismo é ativado logo após a reidratação em solução salina, seguida dos eventos de eclosão do cisto e maturação do náuplio (MORRIS, 1971). Em média, o microcrustáceo atinge o estágio final de desenvolvimento de 36 a 48 horas após a hidratação do cisto.

Figura 13 - Micro crustáceo *A. salina*.



Fonte: (<http://www.warrenphotographic.co.uk/16392-brine-shrimp>, acesso em 04/03/2014).

A *A. salina* é altamente sensível à toxicidade do meio aquático. A poluição do meio por xenobióticos e metais pesados produz respostas imediatas nas populações do ecossistema. JAYASEKARA et al. (1986) avaliaram o grau de tolerância de *A. salina* quando exposta a concentrações elevadas de cádmio no meio, o que indicou intoxicação por incorporação e metabolização do metal pesado. BROWNE (1979) avaliou a resposta da exposição aguda versus o desempenho reprodutivo de cinco cepas diferentes de *A. salina* frente à concentrações crescentes de sulfato de cobre II. A presença do íon metálico Cu^{2+} durante a fase reprodutiva das fêmeas reduziu a viabilidade dos cistos frente aos controles. Em todos os casos, o grau de intoxicação manifesta-se pelo grau de letalidade da população de *A. salina* por exposição aguda ao agente tóxico, o qual pode ser correlacionado com a concentração do agente. Esta sensibilidade é muito usada em laboratórios de pesquisa e controle como modelo confiável para estimar a toxicidade (CL50) de xenobióticos em águas, medicamentos e efluentes (LOGARTO PARRA et al., 2001). O teste de citotoxicidade com *A. salina* (TAS) é um ensaio biológico aplicado como ferramenta preliminar de avaliação de citotoxicidade aguda de xenobióticos com grandes vantagens sobre outros métodos por ser rápido, robusto, barato, fácil de reproduzir e por não demandar instrumentação sofisticada ou ambiente controlado (AMARANTE et al., 2011).

O ensaio TAS é muito aplicado na avaliação da citotoxicidade de produtos da matriz vegetais em geral, como óleos essenciais e extratos concentrados. MEYER et al., (1982) testaram a citotoxicidade aguda de extratos concentrados das sementes de 41 espécies de plantas e obtiveram correlações significativas entre a letalidade e as concentrações dos extratos. A CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental Paulista) utiliza o ensaio TAS padronizado pela ABNT como ensaio de citotoxicidade aguda para avaliação da toxicidade de efluentes e águas residuais (COSTA et al., 2008).

3.8.2 Culturas Celulares

Inicialmente, o cultivo de células data do início de século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. A técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. É uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro. O uso da biotecnologia possibilitou muitos avanços, como a produção de vacinas com a linhagem celular VERO (ALVES & GUIMARÃES, 2007). Contudo, a aplicação em pesquisa para o desenvolvimento de fármacos possui a maior demanda por linhagens celulares. O ensaio de citotoxicidade com culturas de células de mamíferos é uma metodologia padronizada para o estudo da citotoxicidade de xenobióticos.

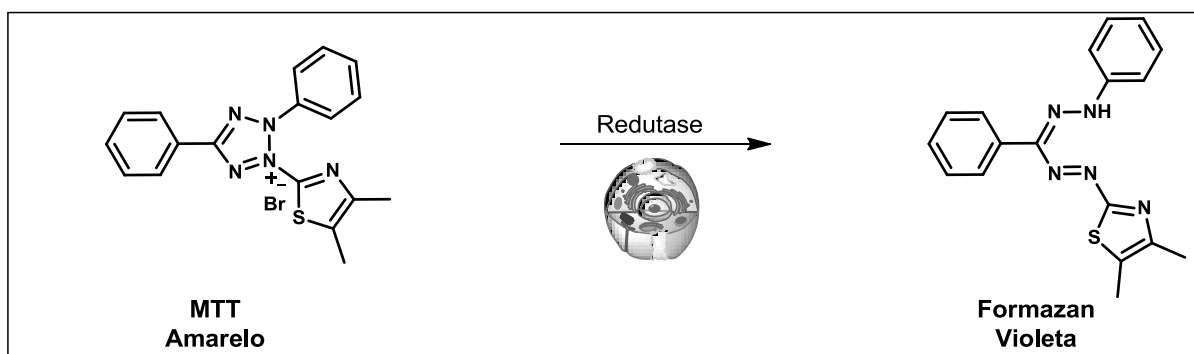
As linhagens celulares utilizadas em estudos de viabilidade são oriundas de tecidos de mamíferos. No geral a célula provém de tecidos normais com alta capacidade proliferativa e adesão, geralmente tecidos glandulares e viscerais. Como exemplo citam-se as linhagens VERO (rim de macaco verde africano) e CHO (ovário de hamster) (ANDRADE, 2007). As linhagens celulares de tecidos tumorais de alta proliferação também são utilizadas para avaliação da atividade antitumoral de compostos em estudo. Estas linhagens provêm de tecidos tumorais humanos, como as linhagens HeLa (colo uterino), MCF-7 (glândulas mamárias), DU-145 (próstata) e SK-OV-3 (ovário) (KELLETT et al., 2012).

As células são cultivadas em meio específico de crescimento (soro fetal bovino) para obtenção de uma monocamada aderida à parede do micro poço. Este sistema de células em cultivo é um modelo de função fisiológica muito contraditória, devido à perda de características que ocorre durante o seu desenvolvimento em cultura. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. Assim, por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo causa problemas para o desenvolvimento celular. Sua adesão célula – célula e célula – matriz é reduzida e não possui as características (heterogeneidade e arquitetura tridimensional) de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado. Células que num momento anterior cresciam tridimensionalmente agora se encontram em um meio que favorece o espalhamento, a migração e a proliferação de células não especializadas que expressem diferentes funções (ALVES & GUIMARÃES, 2007).

3.8.2.1 Viabilidade Celular (ensaio MTT): conceito e aplicações

Os sais de tetrazólio (Figura 14) têm sido utilizados em ensaio colorimétricos quantitativos para avaliação da sobrevivência e proliferação das células de mamífero. O ensaio detecta as células vivas. O sinal gerado é dependente do grau de ativação das células. Este método pode, por conseguinte, ser utilizado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação. Os resultados podem ser lidos em um espectrofotômetro de varredura de poços múltiplos, o qual apresenta um elevado grau de precisão. As principais vantagens do ensaio colorimétrico são a sua rapidez e precisão (MOSMANN, 1983). Os reagentes colorimétricos mais comuns de tetrazólio são o MTT e o XTT. O ensaio espectrofluorimétrico PrestoBlue[®] usa o reagente Resazurin como os mesmo propósito (BONCLER et al., 2014).

Figura 14 - Redução enzimática do MTT à Formazan



Fonte: Adaptado de INTERCHIM INC, (2013)

O ensaio de MTT pode ser usado para a investigação de citotoxicidade de metais e organocomplexos. Os metais de transição são tóxicos para as células na maioria dos casos. SARGAZI et al., (2013) mostraram um estudo viabilidade celular por ensaio MTT com células tratadas com Citrato de Zinco II. Os resultados indicaram que o metal pode induzir danos em células renais tubulares proximais por um mecanismo dependente de íons de Zn (II) intracelular, onde o metal liga-se às organelas celulares e interrompem os processos bioquímicos, uma vez que os danos são iniciados pela a produção de radicais livres e ROS.

A presença excessiva de cobre livre é conhecida por induzir o estresse oxidativo e levar a célula à apoptose (SPINCEMAILLE et al., 2014). BORGES et al., (2013) confirmaram por ensaio MTT a hipótese do sal complexo $\text{Cu}(\text{isaey})_2(\text{ClO}_4)_2$ induzir a formação de ROS e a apoptose em células de neuroblastoma por meio de desacoplamento mitocondrial e da ativação de AMPK/p38/p53. A atividade promotora de ROS do $\text{Cu}(\text{isaey})_2(\text{ClO}_4)_2$ não foi observada para o análogo $\text{Zn}(\text{isaey})_2\text{Cl}_2$, o que indica que o Zn (II)

será tóxico quando estiver na forma de íon livre. GOSWAMI et al., (2013) avaliaram a fotocitotoxicidade de complexos de Cobre-curcumina-N-ferrocenilmetil-L-aminoácidos (grupos cromóforos) frente às linhagens HeLa e MCF-7 em condições de luz e no escuro. Os resultados de viabilidade celular indicaram que a citotoxicidade dos complexos é ativada por irradiação de luz artificial, sendo inativos ao escuro.

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES PARA SÍNTESE

Os reagentes para síntese foram obtidos de fontes comerciais com certificações de qualidade e de pureza. Para a obtenção dos complexos organometálicos utilizaram-se Valproato de Sódio 99% (Valp) AK Scientific[®], Cloreto de Cobre II dihidratado Vetec[®], Cloreto de Zinco II heptahidratado Vetec, 1,10-fenantrolina monohidratada Vetec, 2,2-bipiridina Vetec, Metanol Panreac[®], *N,N*,dimetilformamida (DMF) Vetec e Clorofórmio Fmaia[®].

4.2 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

4.2.1 Preparação dos sais de Valproato de Cu⁺² e Zn⁺² (1 e 2)

Os compostos denominados 1 e 2 são os sais *tetrakis-μ-2-propilpentanoato dicobre II* (Cu₂Valp₄) e *tetrakis-μ-2-propilpentanoato dizinco II* (Zn₂Valp₄) preparados como precursores de outros compostos de coordenação. Estes sais foram preparados de acordo com a descrição de VEITÍA et al., (2009) e ABU et al., (2013) por reações de dupla-troca entre o valproato de sódio e os sais cloreto de cobre (II) e cloreto de zinco (II) em meio aquoso. Para isto pesaram-se quantidades proporcionais (Tabela 1) de cada reagente, de modo a obedecer à razão estequiométrica metal:ligante de 1:2. Ambos os autores referenciados acima apresentam os sais 1 e 2 como sendo moléculas diméricas através de cristalografia.

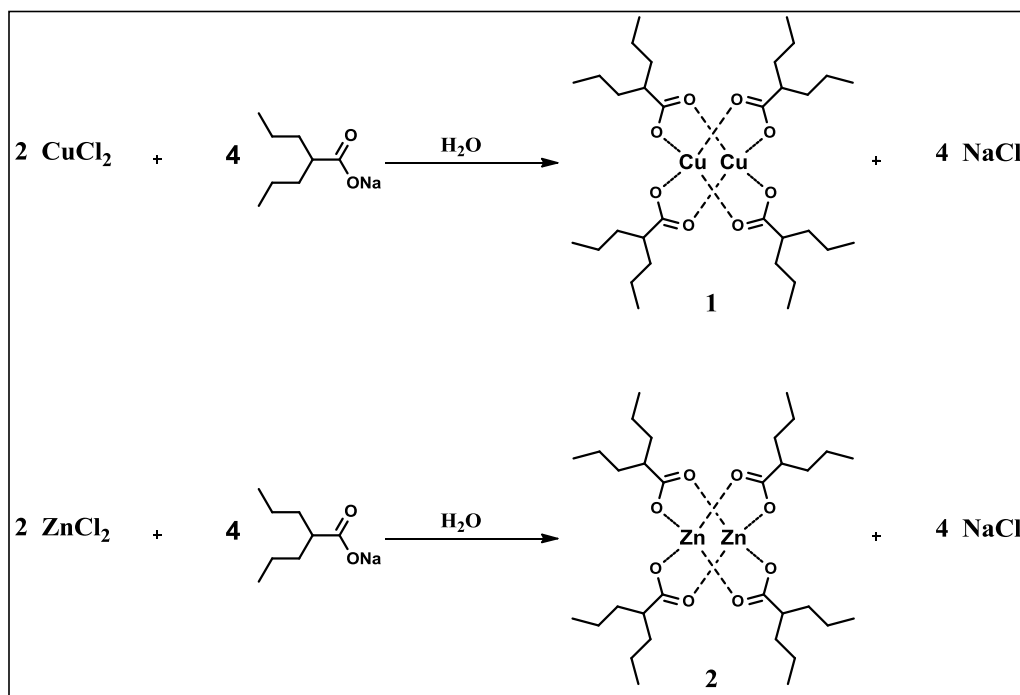
Tabela 1 - Quantidades mássicas e molares dos reagentes para as sínteses dos sais precursores Cu₂(Valp)₄ (1) e Zn₂(Valp)₄ (2).

Precursor	Reagente	MW* (g mol ⁻¹)	Massa (g)	mmol
1	CuCl ₂ .2H ₂ O	170,48	5,0777	29,78
	NaValp	166,20	10,0009	60,17
2	ZnCl ₂ .7H ₂ O	262,38	7,7370	29,49
	NaValp	166,20	10,0011	60,17

MW*: Massa molar, peso molecular

Os reagentes foram solubilizados separadamente em 10,0 mL de água Milli-Q e as soluções foram filtradas em papel-filtro. As soluções dos metais foram colocadas sob agitação à temperatura ambiente e adicionadas lentamente com as respectivas soluções do ligante, nas quais se observaram turvações imediatas. As misturas foram mantidas sob agitação por 2 horas e após foram reservadas para cristalização.

Figura 15 - Rotas de síntese dos sais precursores $Cu_2(Valp)_4$ (1) e $Zn_2(Valp)_4$ (2).



O composto 1 precipitou instantaneamente como um sólido hidrofóbico de cor verde-turquesa finamente dividido e o composto 2 produziu um precipitado hidrofóbico de cor branca na forma de grumos após 24 horas. Os sólidos foram recuperados por filtração, lavados com água Milli-Q e secos sob vácuo até peso constante.

4.2.2 Preparação dos complexos com ligantes neutros 1,10-Phen e 2,2-Bipy

Para o estudo prepararam-se quatro sais complexos: *bis*-(2-propilpentanoato)-(1,10-fenantrolina) cobre (II) (3), *bis*-(2-propilpentanoato)-(2,2'-bipiridina)-aqua cobre (II) (4), *bis*-(2-propilpentanoato)-(1,10-fenantrolina)-aqua zinco (II) (5) e *bis*-(2-propilpentanoato)-(2,2'-bipiridina)-aqua zinco (II) (6). Os complexos foram preparados com as diiminas aromáticas 1,10-Phen e 2,2-Bipy e os compostos de precursores 1 e 2 de acordo com as metodologias adaptadas de ABUHIJLEH (1997), VEITÍA et al., (2009) e ABU et al., (2013). O complexo 6 ($Zn(Valp)_4(2,2-Bipy).H_2O$) é inédito, portanto não possui descrição na

literatura. A metodologia de síntese proposta para a nova molécula foi determinada a partir da metodologia descrita por ABU et al., (2013) para o composto 5. Os complexos secundários foram preparados por reações de adição de ligante neutro (diiminas aromáticas) ao átomo metálico central (Figura 16). Para isto pesaram-se quantidades proporcionais de cada reagente (Tabela 2), de modo a obedecer à razão estequiométrica metal:ligante de 1:1. Ressalta-se que os complexos 3, 4 e 5 possuem proteção para aplicações comerciais com a patente nº US 2012/0142658A1 (VEITÍA et al., 2012).

Tabela 2 - Quantidades dos reagentes para as sínteses dos complexos 3, 4, 5 e 6.

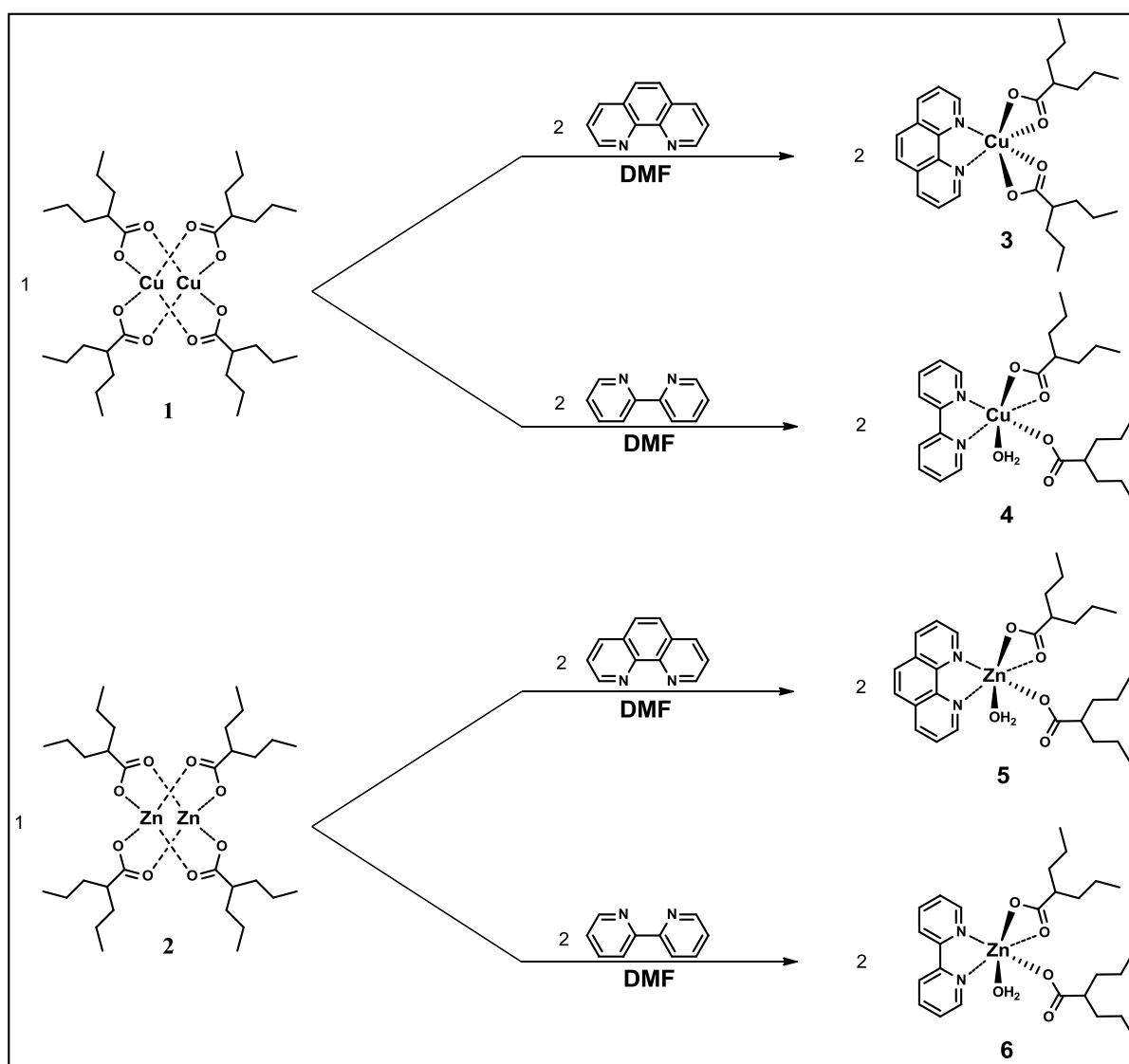
Complexo	Reagente	MW (g mol ⁻¹)	Massa (g)	mmol
3	<i>Cu₂(Valp)₄</i>	699,90	4,0002	5,715
	<i>1,10-Phen.H₂O</i>	198,22	2,2647	11,438
4	<i>Cu₂(Valp)₄</i>	699,90	4,0012	5,717
	<i>2,2-Bipy</i>	156,18	1,7850	11,429
5	<i>Zn₂(Valp)₄</i>	703,57	4,0005	5,686
	<i>1,10-Phen.H₂O</i>	198,22	2,2537	11,369
6	<i>Zn₂(Valp)₄</i>	703,57	4,0010	5,687
	<i>2,2-Bipy</i>	156,18	1,7760	11,371

Para a síntese dos complexos 3 e 4, as massas do sal precursor 1 foram dissolvidas em 20,0 ml de DMF aquecido à ≈ 80 °C e com agitação constante, as quais produziram soluções de coloração verde. As massas dos ligantes neutros *1,10-Phen* e *2,2-Bipy* foram solubilizadas em 5,0 mL de DMF a frio e com agitação constante, as quais produziram soluções incolores. Ambas as soluções foram filtradas em papel-filtro para remoção de resíduos sólidos insolúveis e particulados em suspensão. Na sequência, os pares de soluções Precursor 1 + *1,10-Phen* e Precursor 1 + *2,2-Bipy* foram juntados com a adição do ligante sobre o sal precursor em alíquotas de 1,0 mL e com agitação constante. Produziram-se soluções de coloração azul-turquesa límpidas, as quais foram armazenadas em frascos fechados e ao abrigo da luz para induzir a cristalização.

Para a síntese dos complexos 5 e 6, as massas do sal precursor 2 foram dissolvidas em 10 ml de DMF aquecido à ≈ 60 °C e com agitação constante, as quais produziram soluções de coloração amarelo-claro. As massas dos ligantes neutros *1,10-Phen* e *2,2-Bipy* foram solubilizadas em 5,0 mL de DMF a frio e com agitação constante, as quais produziram soluções incolores. Ambas as soluções foram filtradas em papel-filtro para remoção de

resíduos sólidos insolúveis e particulados em suspensão. Na sequência, os pares de soluções Precursor 2 + *1,10-Phen* e Precursor 2 + *2,2-Bipy* foram juntados com a adição do ligante sobre o sal precursor em alíquotas de 1,0 mL e com agitação constante. Produziram-se soluções de coloração amarelo-claro límpidas, as quais foram armazenadas em frascos fechados e ao abrigo da luz para induzir a cristalização.

Figura 16 - Rotas de síntese dos complexos $Cu(Valp)_2(1,10-Phen)$ (3), $Cu(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (4), $Zn(Valp)_2(1,10-Phen).H_2O$ (5) e $Zn(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (6).



4.2.2.1 Recuperação dos compostos 3, 4, 5 e 6

O complexo 3 cristalizou após 48 horas sob a forma de agulhas finas de coloração verde-turquesa, como descrito por VEITÍA et al., (2009). Os cristais foram lavados a frio com

DMF e filtrados a vácuo. A massa recuperada foi seca sob vácuo por 12 horas e armazenada em frasco de vidro âmbar.

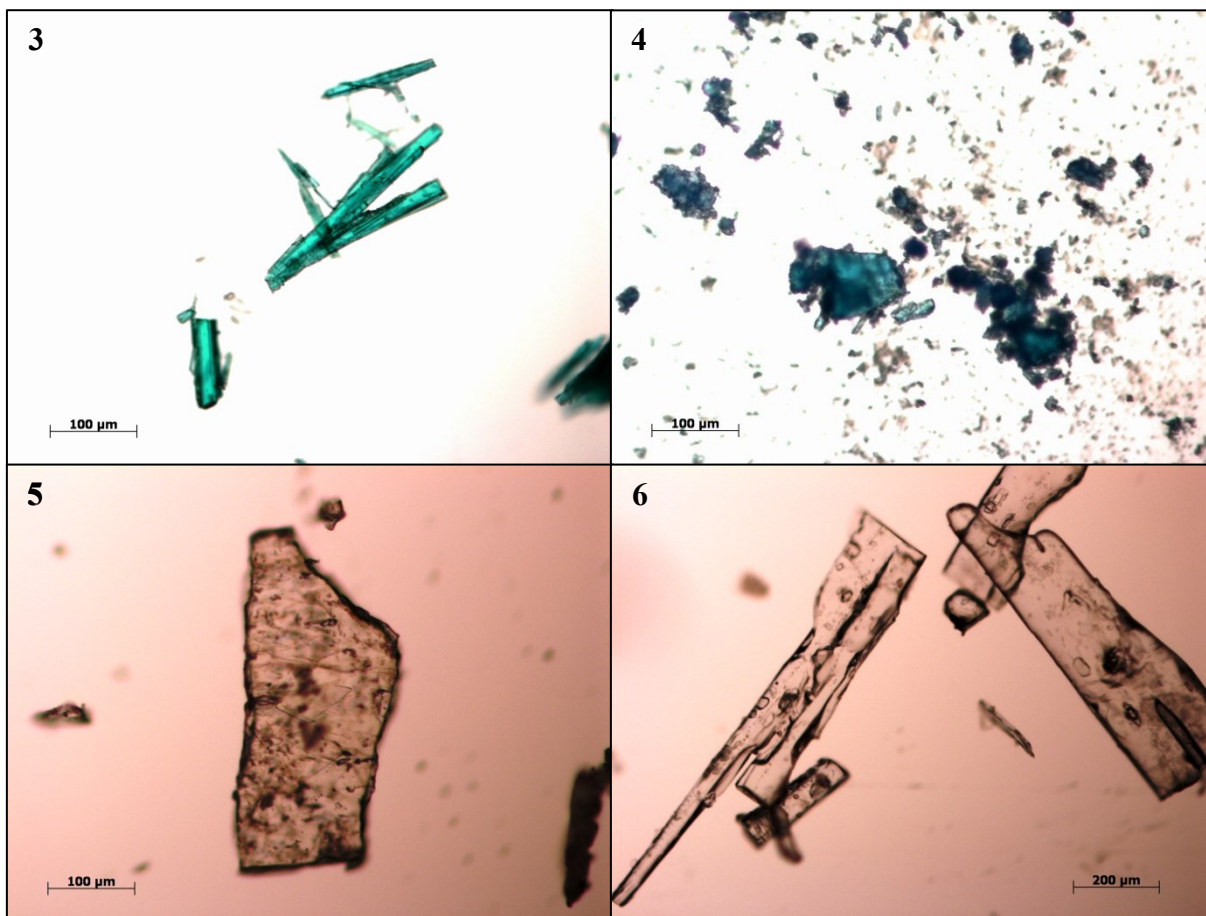
A solução do complexo 4 não cristalizou após 48 horas. O solvente DMF foi removido à pressão reduzida com auxílio de evaporador rotativo, e a massa resultante foi ressuspensa em 20 mL de clorofórmio, de acordo com o método descrito por ABUHIJLEH, (1997). O solvente foi evaporado lentamente com auxílio de uma corrente de N_2 seco sobre a solução até a saturação e consequente cristalização do complexo. Os cristais azuis foram lavados com DMF a frio e secas sob vácuo por 12 horas. Armazenou-se em frasco de vidro âmbar.

O complexo 5 cristalizou após o esfriamento da mistura reagente com a formação de cristais transparentes de morfologia de lâminas, de acordo com a descrição de ABU et al., (2013). Os cristais foram recuperados após 24 horas, com lavagem a frio com DMF e filtração seguida de secagem sob vácuo por 12 horas e armazenamento em frasco de vidro âmbar.

A solução do complexo 6 não apresentou cristalização após 24 horas. A solução foi concentrada em evaporador rotativo e à pressão reduzida até a remoção de 7-8 mL do solvente DMF ($\approx 50\%$ do volume inicial). A solução concentrada foi reservada e a cristalização iniciou após ≈ 30 minutos. Os cristais transparentes com morfologia de lâminas planas foram lavados com DMF a frio e recuperados por filtração. Secou-se sob vácuo por 12 horas e armazenou-se em frasco de vidro âmbar.

As morfologias dos cristais dos compostos 3, 4, 5 e 6 foram analisadas em microscópio óptico. As microfotografias (Figura 17) foram obtidas sob luz branca com magnitudes de aumento de 50 vezes (6) e 100 vezes (3, 4 e 5).

Figura 17 - Microfotografias dos complexos $Cu(Valp)_2Phen$ (3), $Cu(Valp)_2Bipy.H_2O$ (4), $Zn(Valp)_2Phen.H_2O$ (5), $Zn(Valp)_2Bipy.H_2O$ (6).



4.3 ANÁLISES INSTRUMENTAIS PARA IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

4.3.1 Determinação dos pontos de fusão (PF)

Os pontos de fusão dos complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram determinados por fusiometria capilar, com auxílio de um aparelho de ponto de fusão analógico Fisatom, modelo 431. Aliquotas de ≈ 1 mg de cada complexo foram acondicionadas em tubos capilares de vidro com diâmetro de 1,0 mm com a ponta selada. O equipamento foi ajustado com taxa de aquecimento constante de ≈ 5 °C durante toda a leitura. O ponto de fusão foi determinado mediante ao início da mudança de fase sólido-líquido, com o valor da temperatura instantânea lida na escala de um termômetro de mercúrio acoplado. O sistema de resfriamento foi acionado após a fusão completa de cada amostra para induzir a solidificação, seguida pelo

reaquecimento da mesma para uma nova determinação. O procedimento foi repetido três vezes para a confirmação do ponto de fusão.

4.3.2 Análise dos grupos funcionais por FTIR

Os compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram analisados por FTIR para verificação dos grupos funcionais orgânicos presentes nas estruturas químicas. Alíquotas de 1,0 mg de cada composto seco foram misturadas à 100,0 mg de *KBr* (grau espectroscópico) e mantidos sob vácuo por 24 h. As misturas foram trituradas e homogeneizadas em gral de ágata e moldadas na forma de discos em prensa hidráulica, com pressão nominal de 10^3 Kg cm^{-2} . Os discos prensados foram analisados em espectrômetro Perkin Elmer[®], modelo Spectrum 400 previamente calibrado por background da atmosfera ambiente para a supressão das interferências da umidade e do dióxido de carbono. Os espectros foram obtidos em modo de % de transmitância em janela espectral de 4000,0 a 400,0 cm^{-1} , com resolução de 1,0 cm^{-1} e um total de 32 escaneamentos. Os espectros foram tratados com ferramentas de software para correção automática da linha de base e para marcação das bandas mais intensas. Os espectros foram interpretados com auxílio do software IR Tutor, da Perkin Elmer[®] e com o uso de dados obtidos de SILVERSTEIN, (1998).

4.3.3 Determinação dos teores de Cobre e Zinco por FAAS

Os compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram analisados pela técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica de Chama para determinação quantitativa dos teores de metais cobre e zinco. Alíquotas de cada complexo foram acondicionadas em frascos de vidro e mantidas sob vácuo por 12 horas. Após, determinaram-se as massas exatas em balança semi-microanalítica Ohaus[®], modelo Analytical 200 Plus (erro $\pm 0,00002\text{g}$). A abertura das amostras foram realizadas com adição de HNO_3 69% (grau espectroscópico) e aquecimento em chapa até a digestão completa da fração orgânica. As amostras digeridas foram arrefecidas à temperatura ambiente, transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume foi completado com água MilliQ[®]. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer[®] A200, modelo AAnalyst 200 pela técnica de absorção de chama ar-acetileno. As curvas de calibração foram preparadas a partir de solução-padrão autêntico de cobre e zinco de 1000 ppm fornecido pela Merck[®].

4.3.4 Análise de ^1H RMN e ^{13}C RMN

Apenas os compostos 2, 5 e 6 puderam ser analisados por RMN. A razão é a presença do Zn^{+2} , uma espécie metálica diamagnética. Os compostos 1, 3 e 4 não podem ser analisados por RMN em razão do Cu^{+2} ser paramagnético e interferir diretamente nos tempos de relaxação dos núcleos em análise.

Foram utilizadas alíquotas de 10 mg de cada complexo para análise dos núcleos de ^1H e alíquotas de 100 mg para análise dos núcleos de ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em 500 μL de CDCl_3 , acondicionadas em tubos de vidro e analisadas em dois espectrômetros diferentes: Bruker Avance 400 (Composto 2) e Varian Inova 300 (Compostos 5 e 6). Os espectros de ^1H foram obtidos em 400,13 MHz (Composto 2) e a 299,96 MHz (Compostos 5 e 6) no modo acoplado, com janelas espectrais de -2 a 16 ppm. Os espectros de ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Varian Inova 300 em 75,43 MHz no modo desacoplado, com janela espectral de -10 a 210 ppm. O sinal do CHCl_3 residual com deslocamento químico δ 7,26 ppm (singlete) foi utilizado como referência para escalonar os sinais nos espectros de ^1H . Para os espectros de ^{13}C utilizou-se o sinal tripleto do CDCl_3 com δ 77,00 ppm.

4.3.5 Análise espectrofotométrica de UV-Vis

Os complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram analisados por espectrofotometria de UV-Vis para a verificação da presença de bandas características de grupos funcionais presentes nos complexos. O experimento foi executado em um espectrofotômetro Beckman[®], modelo DU 530 com feixe único e cubeta de quartzo de 0,5 mL de capacidade e cominho óptico de 1,0 cm. O equipamento foi configurado no modo de escaneamento, com janela espectral de 190 a 400 nm e a calibração da linha de base foi obtida com o solvente clorofórmio. Os espectros de absorção de UV-Vis foram obtidos a partir das soluções dos complexos preparadas em clorofórmio em concentrações de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.6 Análise de espectrometria de massas de alta resolução

Os complexos 3, 4, 5 e 6 foram analisados por HD-MS para obtenção dos dados de m/z correspondentes aos íons derivados das fragmentações, os quais foram utilizados como ferramenta auxiliar para a confirmação das estruturas moleculares dos mesmos. Para a

referida análise, alíquotas sólidas de cada complexo foram solubilizadas em metanol para obter-se soluções de $\approx 1 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$ e analisadas por infusão direta em um espectrômetro Bruker micrOTOF-Q II acoplado com fonte de electrospray (ESI). As análises foram configuradas com os seguintes parâmetros: janela espectral: 50 a 1200 m/z; pressão do nebulizador de 0,4 bar; gás de secagem N_2 a 180°C e fluxo de $5,0 \text{ L min}^{-1}$; ddp do capilar - 3500 V para análise no modo íons positivos. Os espectros foram obtidos e tratados com auxílio do software Compass Data Analysis 4.0.

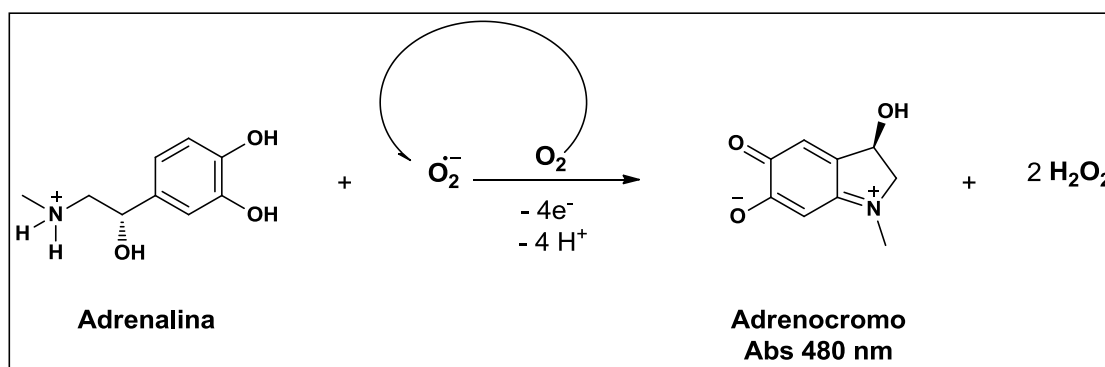
4.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE MIMÉTICA DE *SOD-LIKE* E *CAT-LIKE*

Estes experimentos exploram o potencial redox dos complexos metálicos. Os princípios dos métodos residem no fato de algumas moléculas mimetizarem o efeito redox das enzimas Catalase (Cat) e Superóxido dismutase (Sod) quando expostas às espécies reativas de oxigênio superóxido ($\text{O}^{\cdot-}$) e peróxido (O_2).

4.4.1 Ensaio de Sod-like

O ensaio de superóxido dismutase (*Sod-like*) foi realizado através da avaliação da inibição da taxa de formação de adrenocromo autocatalítico produzido pela reação entre epinefrina (adrenalina) e o ânion-radical superóxido oriundo do oxigênio molecular presente na solução.

Figura 18 - Reação auto catalítica de oxidação da adrenalina a adrenocromo.



Fonte: Adaptado de SZIGYÁRTÓ et al., (2013).

Para o resultado ser considerado positivo, o composto em teste deve mimetizar o efeito catalítico de uma enzima SOD como dismutador do radical-ânion superóxido à

peróxido de hidrogênio, uma espécie de ROS menos reativa. A reação foi preparada em uma cubeta de vidro, onde adicionaram-se soluções aquosas de 1,0 mmol L⁻¹ de adrenalina em pH 2,0 e 50,0 mmol L⁻¹ de glicina pH 10,2. A solução etanólica do complexo foi adicionada à cubeta e a reação foi monitorada em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1700 à 480 nm e à temperatura constante de 30 °C, segundo BANNISTER & CALABRESE, (1987). Os resultados foram expressos como unidades de superóxido dismutase (USOD). Uma unidade da enzima SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação de adrenocromo em 50%.

4.4.2 Ensaio de *Cat-like*

Ensaio de *Cat-like* foi realizado de acordo com o método descrito por AEBI, 1984. O ensaio determina a taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio H_2O_2 monitorado espectrofotometricamente à 240 nm em pH 7,4. A reação foi conduzida a 30 °C durante 1 min. Os resultados são expressos como unidades de catalase (UCAT). Uma unidade de UCAT é definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 mmol de H_2O_2 em 1 minuto a pH 7,4. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1700.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM *ARTEMIA SALINA*

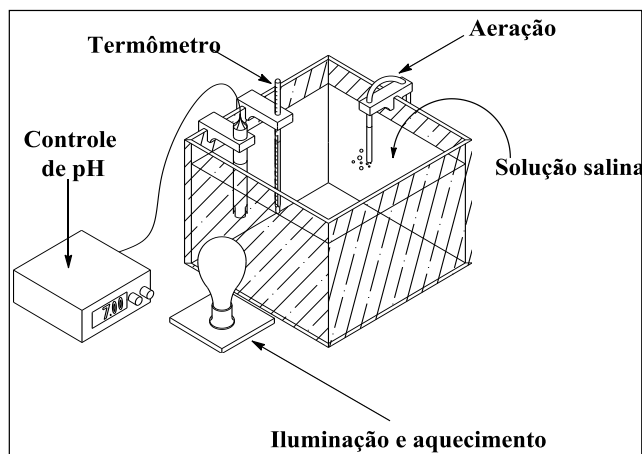
Os ensaios biológicos com *A. salina* visaram determinar a citotoxicidade aguda dos complexos 3, 4, 5 e 6 e controles e obter a CL₅₀ para o modelo em estudo. O procedimento foi executado segundo metodologia descrita por MEYER et al., (1982) para eclosão e incubação dos náuplios.

4.5.1 Eclosão dos cistos de *A. salina*

O meio de cultura consistiu de 2,0 L de solução salina preparada com água Milli-Q e sal marinho a 36,5 g L⁻¹. A solução foi filtrada e acondicionada em um aquário de vidro (25x15x20 cm), onde se adicionaram 0,2 g de ovos de *A. salina* para incubação. O sistema foi mantido com aeração constante, a temperatura mantida no intervalo de 27 a 30 °C e pH controlado no intervalo de 7,0 a 9,0 (Figura 19). O aquecimento e a iluminação foram fornecidos por uma lâmpada incandescente de 60 W. Foram adicionadas 0,2 g de fermento

biológico seco (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte alimentação para os náuplios após 30 h de incubação.

Figura 19 - Sistema para eclosão e crescimento de *A. salina*.



4.5.2 Preparo das amostras para incubação

Foram pesadas alíquotas de 50,0 mg dos complexos $Cu(Valp)_2Phen$, $Cu(Valp)_2Bipy.H_2O$, $Zn(Valp)_2Phen.H_2O$ e $Zn(Valp)_2Bipy.H_2O$. Cada amostra foi misturada de 365,0 mg de $NaCl$ e moída com auxílio de gral e pistilo de ágata. As misturas pulverizadas foram suspensas em água Milli-Q e Tween 80 a 1,0% em balões volumétricos de 10,0 mL e homogeneizadas em banho de ultrassom por 10 minutos, as quais produziram suspensões coloidais. A solução-branco foi preparada com solução salina 3,65% + Tween 80 a 1,0%. Produziram-se também ensaios de controle com $NaValp$, $1,10-Phen$, $2,2-Bipy$ e $K_2Cr_2O_7$ em concentrações $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ com as mesmas condições de solvente.

4.5.3 Incubação

O procedimento de transferência foi iniciado após 48 h de incubação, com uso de placas para cultura celular de 24 poços. Um total de 18 a 22 náuplios foram transferidos para cada poço com uso de micropipetador automático, juntamente com $800 \mu\text{L}$ da solução salina. Na sequência, adicionaram-se combinações de $200 \mu\text{L}$ das soluções de amostra + solução-branco (solução salina + Tween 80 1,0%) de modo a obter as concentrações de 1000,0, 750,0, 500,0, 250,0, 100,0, 50,0 e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os compostos 3, 4, 5, 6 e o controle $NaValp$. Os controles $1,10-Phen$, $2,2-Bipy$ e $K_2Cr_2O_7$ foram preparados seguindo a mesma metodologia descrita acima, porém as concentrações finais para o teste foram de 100, 75, 50, 25, 10, 5 e 1

$\mu\text{g mL}^{-1}$. Os controles negativos consistiram de 200 μL de solução em branco. Cada concentração foi replicada 4 vezes dentro de cada ensaio. Os experimentos foram mantidos incubados por 24 horas nas mesmas condições de temperatura de eclosão, porém sem iluminação direta. A contagem do número de mortos foi realizada em microscópio estereoscópico com iluminação, no qual se considerou morto o náuplio imóvel ao estímulo luminoso. O experimento foi repetido três vezes e em dias diferentes.

4.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade dos complexos 5 e 6 foi determinada por exposição de culturas celulares a diferentes concentrações de cada complexo.

4.6.1 Cultura de células

Para o estudo utilizaram-se células de ovário de hamster (CHO). A linhagem celular CHO-K1 (ATCC CCL-61) foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL; Life Technologies) e 1% de penicilina-estreptomicina em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 e temperatura controlada a 37 °C. As células foram incubadas em microplacas de 96 poços em concentrações de 8×10^4 unidades mL^{-1} . Aliquotas dos complexos 5 e 6 foram solubilizadas em etanol/água 80/20% e filtradas em membrana estéril 20 μm . As soluções dos complexos foram diluídas em meio de cultura para obtenção das concentrações de 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguida de aplicação sobre as culturas celulares. Cada concentração foi testada em duplicata. As avaliações de viabilidade celular foram realizadas após de 24 horas de exposição ao complexo organometálico. O procedimento foi replicado três vezes em dias diferentes.

4.6.2 Ensaio MTT

A viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT (brometo de (3- 4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de acordo com metodologia descrita por DENIZOT & LANG, (1986), partindo-se de uma concentração celular de 8×10^4 células mL^{-1} . Após

remoção do meio com o tratamento foi acrescentado 0,1 mL de meio DMEM sem soro contendo MTT ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$). A mistura foi incubada em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com 5% de CO_2 por duas horas. O meio com MTT foi retirado e o precipitado formado dissolvido em DMSO com posterior agitação por 30 minutos.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Molecular Devices[®], modelo Spectra Max M2^e, foi realizada em 570 nm e os resultados expressos em porcentagem de viabilidade. A absorbância do controle negativo (células que não receberam tratamento com o complexo metálico) representou 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculadas como porcentagem do controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2 RECUPERAÇÃO DOS PRODUTOS DE SÍNTESE

Os rendimentos estequiométricos dos compostos precursores 1 e 2 estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimentos obtidos para os sais precursores 1 e 2.

Composto	MW (g.mol ⁻¹)	Rendimento (%)
<i>Cu₂(Valp)₄ (1)</i>	699,90	99
<i>Zn₂(Valp)₄ (2)</i>	703,57	88

Os compostos 1 e 2 apresentaram rendimentos correspondentes às descrições de VEITÍA et al., (2009) e ABU et al., (2013).

Os rendimentos estequiométricos dos compostos 3, 4, 5 e 6 estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimentos obtidos para os complexos 3, 4, 5 e 6

Composto	MW (g mol ⁻¹)	Rendimento (%)
<i>Cu(Valp)₂(1,10-Phen) (3)</i>	530,16	88
<i>Cu(Valp)₂(2,2-Bipy).H₂O (4)</i>	524,15	99
<i>Zn(Valp)₂(1,10-Phen).H₂O (5)</i>	550,01	90
<i>Zn(Valp)₂(2,2-Bipy).H₂O (6)</i>	525,98	59

Os compostos 3 e 4 apresentaram rendimentos correspondentes às descrições de VEITÍA et al., (2009) e ABUHIJLEH, (1997). O composto 5 apresentou um rendimento de 90%, um valor 85% superior ao rendimento reportado por ABU et al., (2013). O rendimento superior pode ser atribuído às modificações no método, como o uso de DMF como solvente em detrimento ao metanol utilizado na técnica original. O resultado apresenta um melhoramento da técnica. O composto 6 é inédito, portanto não possui literatura para comparação.

5.3 ELUCIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPLEXOS

Os complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram analisados por diversas técnicas de caracterização química para confirmação das fórmulas moleculares e dos arranjos atômicos.

5.3.1 Análise dos pontos de fusão (PF)

Os pontos de fusão dos complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram determinados pela técnica de fusiometria capilar (Tabela 5). As leituras foram realizadas em triplicata e todos os resultados foram coincidentes.

Tabela 5 - Pontos de fusão dos complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Complexo	PF (°C)
$Cu_2(Valp)_4$ (1)	312
$Zn_2(Valp)_4$ (2)	207
$Cu(Valp)_2(1,10-Phen)$ (3)	202
$Cu(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (4)	93
$Zn(Valp)_2(1,10-Phen).H_2O$ (5)	223
$Zn(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (6)	150

Todos os complexos apresentaram fusão homogênea e recristalizaram após resfriamento. Os valores de PFs para os compostos 1 e 3 corroboram com a descrição de VEITÍA et al., (2009), os quais evidenciam que a técnica de síntese foi reproduzida com sucesso e se trataram das mesmas moléculas. O composto 2 fundiu com uma diferença de 43 °C abaixo do valor descrito por ABU et al., (2013), enquanto o composto 5 fundiu com uma diferença de 20 °C acima do valor descrito na mesma referência. Os compostos 4 e 6 (inédito) não dispunham de dados de PF na literatura para comparação.

Segundo MINAMISONO & TAKIYAMA, (2013), as diferenças dos PFs podem resultar da formação de polimorfos decorrentes de variações sutis do procedimento de síntese, como temperatura, concentração e pureza dos reagentes e dos solventes e velocidade de cristalização. Estas variáveis também podem produzir complexos com diferentes graus de hidratação, os quais podem apresentar PFs diferentes para o mesmo composto.

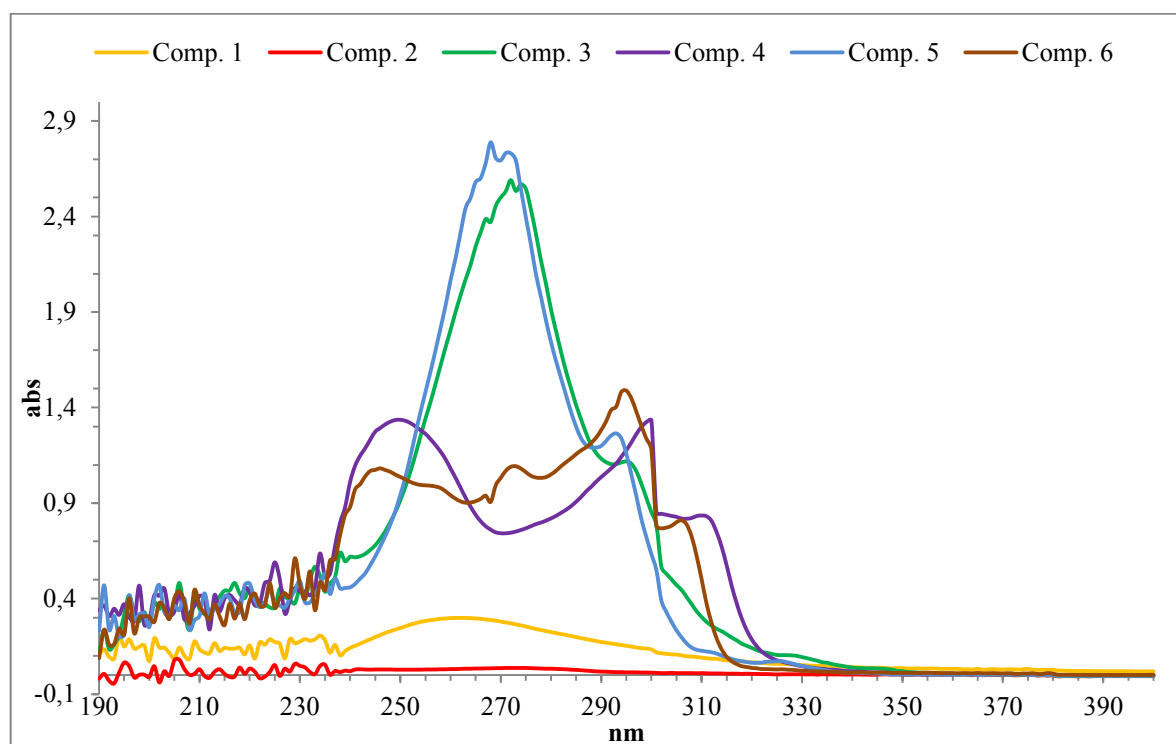
A técnica de PF é uma metodologia exploratória e comparativa, porém pouco conclusiva para a determinação das estruturas moleculares.

5.3.2 Análise dos espectros de UV-Vis

As soluções dos complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram absorção de radiação UV-Vis com maiores intensidades entre λ 230-330 (Figura 20). O composto 5

apresentou um padrão de absorção concordante com a descrição de ABU et al., (2013). As bandas de absorção para os compostos 3 - 5 e 4 - 6 apresentaram posicionamentos e padrões similares à descrição de LINNELL & KACZMARCZYK, (1961) para o ligante *1,10-Phen* e *2,2-Bipy* puros, os quais evidenciam a presença dos referidos ligantes nas estruturas moleculares dos complexos. Os compostos precursores 1 e 2 apresentaram absorções com intensidades inferiores aos compostos 3, 4, 5 e 6.

Figura 20 - Espectros de absorção no UV-Vis para os complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.



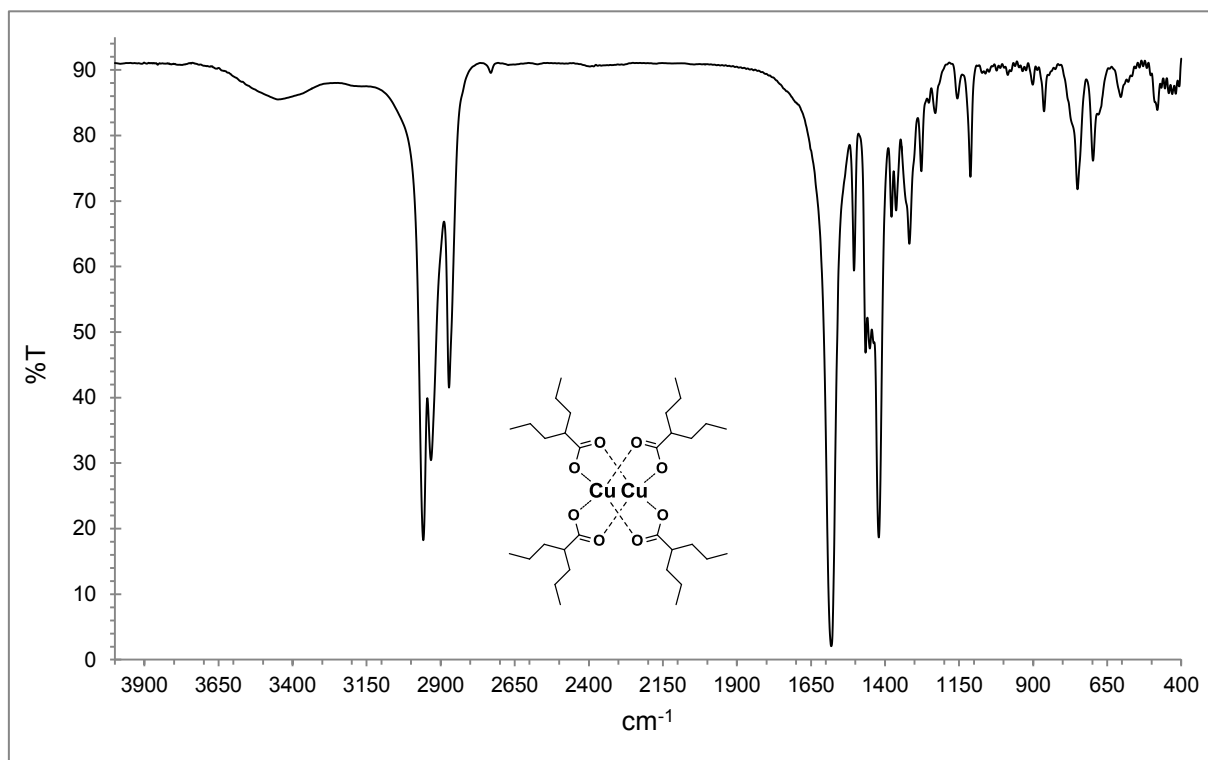
Os baixos coeficientes de absorção molares dos compostos 1 e 2 para a janela espectral é justificável pelo fato de apenas as ligações do tipo π e elétrons livres absorvem radiofrequências na faixa de 200 a 400 nm (SKOOG, 2000). Os grupos carboxilatos de ácidos carboxílicos são grupos cromóforos de baixa absorção, e as contribuições nas massas molares destes grupos na massa molecular dos compostos é baixa. Os complexos 3 e 5 possuem 1 equivalente molar do grupo *1,10-Phen* por mol de complexo. Os elétrons π ressonantes do sistema aromático do grupo *1,10-Phen* proporcionam alto coeficiente de absorção molar, com máximos de absorção localizados em λ 260-280 nm. As intensidades similares de absorção para os complexos 3 e 5 para as mesmas concentrações molares evidenciam a similaridade estrutural das duas substâncias. Os complexos 4 e 6 possuem 1 equivalente molar do grupo *2,2-Bipy*. Similar ao grupo *1,10-Phen*, o *2,2-Bipy* também possui sistemas de elétrons π ressonantes do seu sistema aromático, o qual proporciona alto coeficiente de absorção molar com máximos de absorção nos intervalos λ 295-300 nm e λ 240-260 nm. As intensidades

similares de absorção para os complexos 4 e 6 para as mesmas concentrações molares evidenciam a similaridade estrutural das duas substâncias.

5.3.3 Análise dos espectros de FTIR para todos os complexos

O espectro de FTIR para o complexo 1 (Figura 21) apresentou bandas características para grupo carboxilato alifático similar à descrição de VEITÍA et al., (2009).

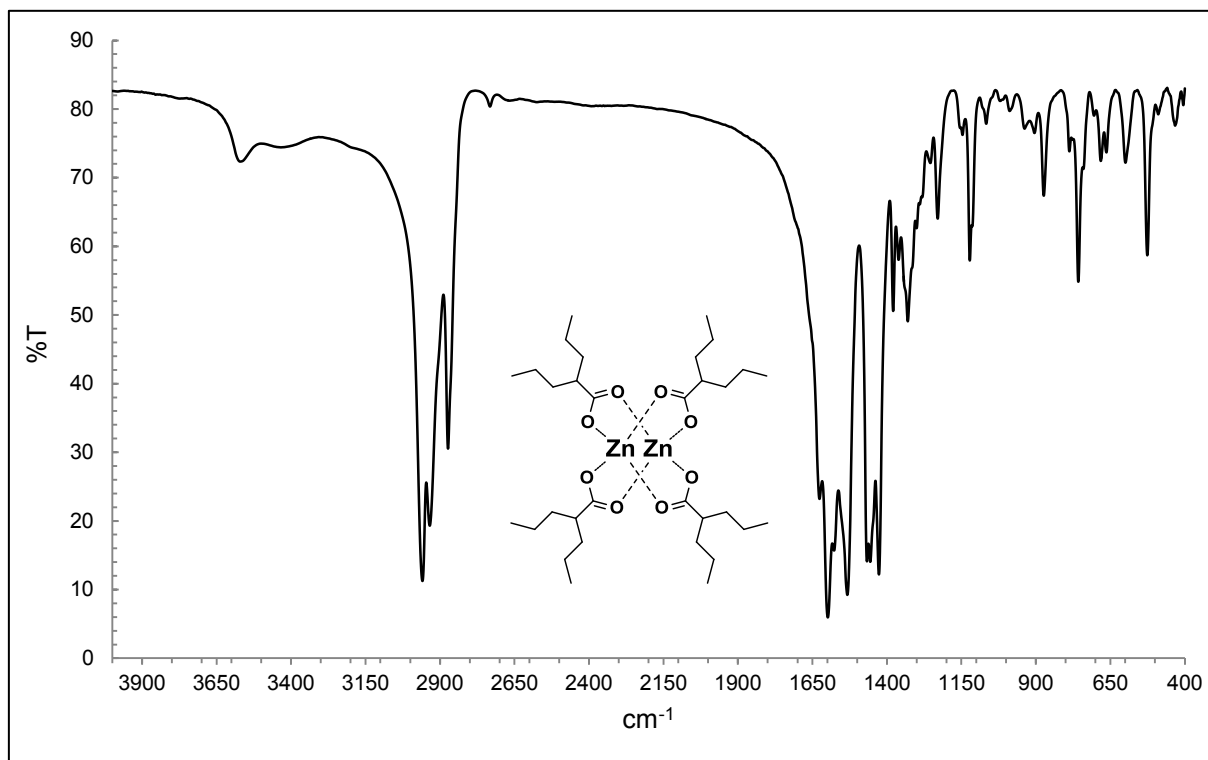
Figura 21 - Espectro de FTIR do complexo precursor 1.



As bandas alongadas em 2960 cm^{-1} , 2951 cm^{-1} e 2863 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ das metilas do valproato, a estiramentos antissimétricos dos hidrogênios metilênicos das cadeias alquílicas e aos estiramentos simétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metil e metileno do valproato. A banda correspondente ao estiramento da ligação $O=Csp^2$ do grupo carbonila aparece em 1584 cm^{-1} . Em 1422 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $O-Csp^2-Csp^3$, o qual envolve o grupo carboxilato e o carbono α -carbonílico. As bandas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem ao intervalo conhecido como impressão digital da molécula. A banda arredondada presente em 3450 cm^{-1} refere-se à água de hidratação, seja na forma de umidade residual do composto ou da pastilha de KBr por exposição ao ar úmido durante o procedimento.

O espectro de FTIR para o complexo 2 (Figura 22) apresentou bandas características para grupo carboxilato alifático similares as descritas por ABU et al., (2013).

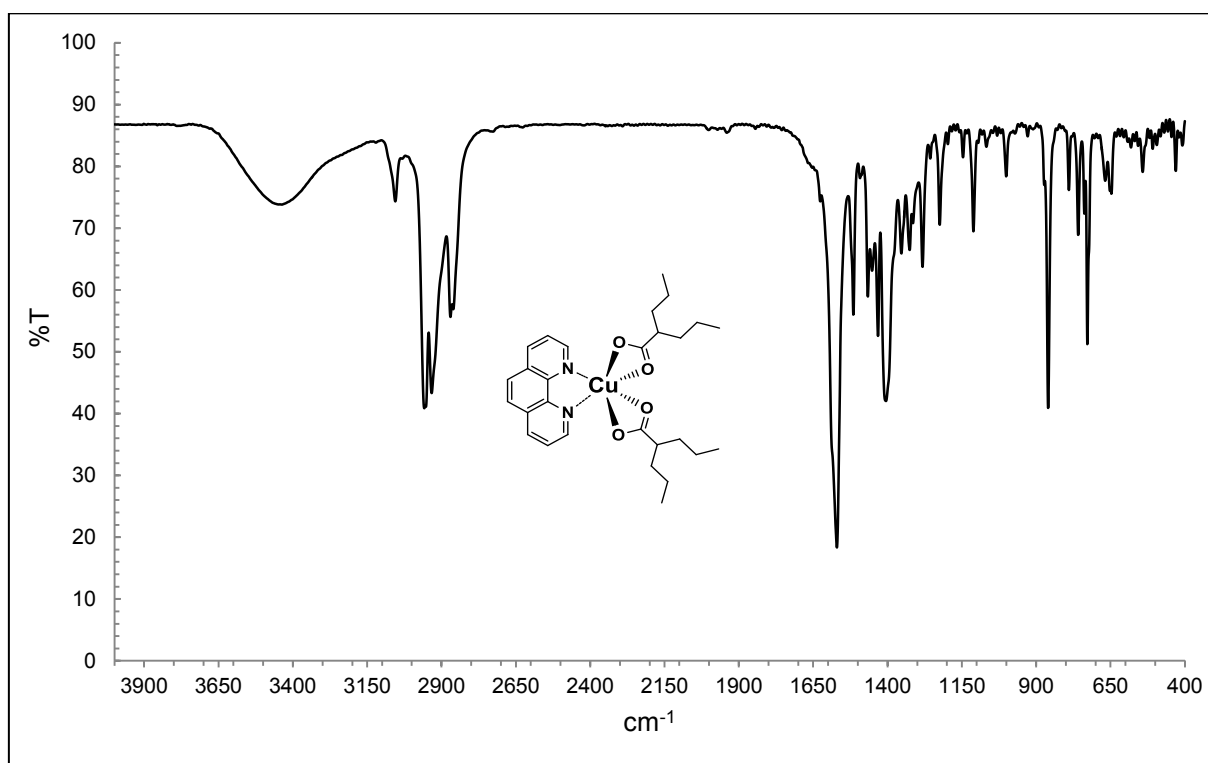
Figura 22 - Espectro de FTIR do complexo precursor 2.



As bandas alongadas em 2961 cm^{-1} , 2951 cm^{-1} e 2874 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ das metilas do valproato, aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ metilênicas das cadeias alquílicas e aos estiramentos simétricos das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metil e metileno da cadeia alquílica. O grupo de bandas alongadas localizadas entre 1600 e 1530 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações $O=Csp^2$ do grupo carbonila. As bandas localizadas em 1468 cm^{-1} correspondem à deformações angulares assimétricas dos grupos metil e metileno. Em 1428 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $O-Csp^2-Csp^3$, o qual envolve o grupo carboxilato e o carbono α -carbonílico. As bandas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem a impressão digital da molécula. A banda arredondada presente em 3450 cm^{-1} refere-se à água de hidratação, seja na forma de umidade do composto ou da pastilha de KBr por exposição ao ar úmido durante o procedimento.

O espectro de FTIR para o complexo 3 (Figura 23) apresentou bandas características para grupo carboxilato alifático e grupo aromático concordantes com a descrição de VEITÍA et al., (2009).

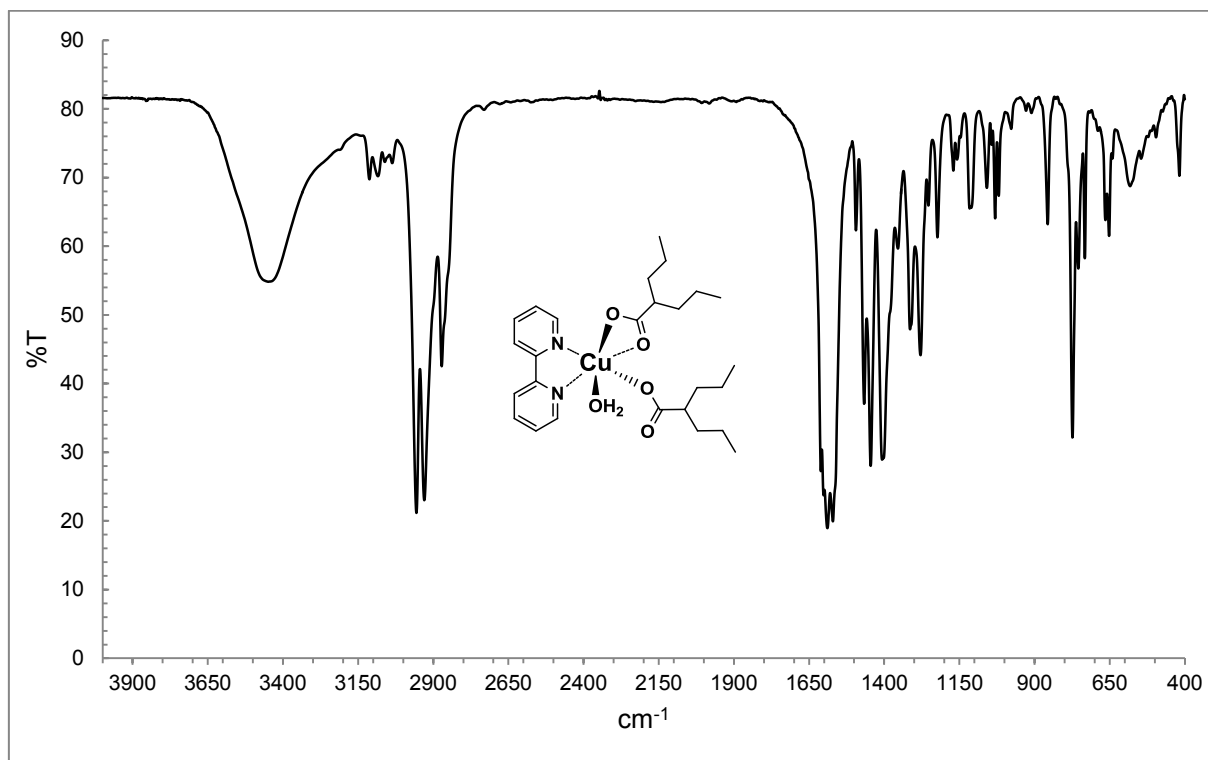
Figura 23 - Espectro de FTIR do complexo 3.



A banda curta em 3057 cm^{-1} corresponde aos estiramentos das ligações $H-Csp^2$ do grupo *1,10-Phen*. As banda alongadas em 2959 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} e 2870 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metílicos do valproato, aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metilênicos das alquílicas do valproato e aos estiramentos simétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metil e metileno do valproato. A banda correspondente ao estiramento da ligação $O=Csp^2$ grupo carbonila aparece em 1569 cm^{-1} . A banda localizada em 1466 cm^{-1} corresponde à deformações angulares assimétricas das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metil e metileno. A banda delgada em 1514 cm^{-1} compreende diferentes estiramentos das ligações Csp^2-Csp^2 dos anéis aromáticos. Em 1408 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $O-Csp^2-Csp^3$, o qual envolve o grupo carboxilato e o carbono α -carbonílico. A banda alongada em 727 cm^{-1} corresponde à deformação angular $H-Csp^2$ aromática fora do plano. As bandas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem a impressão digital da molécula. A banda arredondada presente em 3450 cm^{-1} refere-se à água de hidratação, seja na forma de umidade do composto ou da pastilha de *KBr* por exposição ao ar úmido durante o procedimento. Sínteses similares descritas por ABUHIJLEH, (1993) e VEITÍA et al., (2009) não identificaram moléculas de água quimicamente ligada ao centro metálico de Cobre II.

O espectro de FTIR para o complexo 4 (Figura 24) apresentou bandas características para grupo carboxilato alifático e grupo aromático concordantes com a descrição de ABUHIJLEH, (1997).

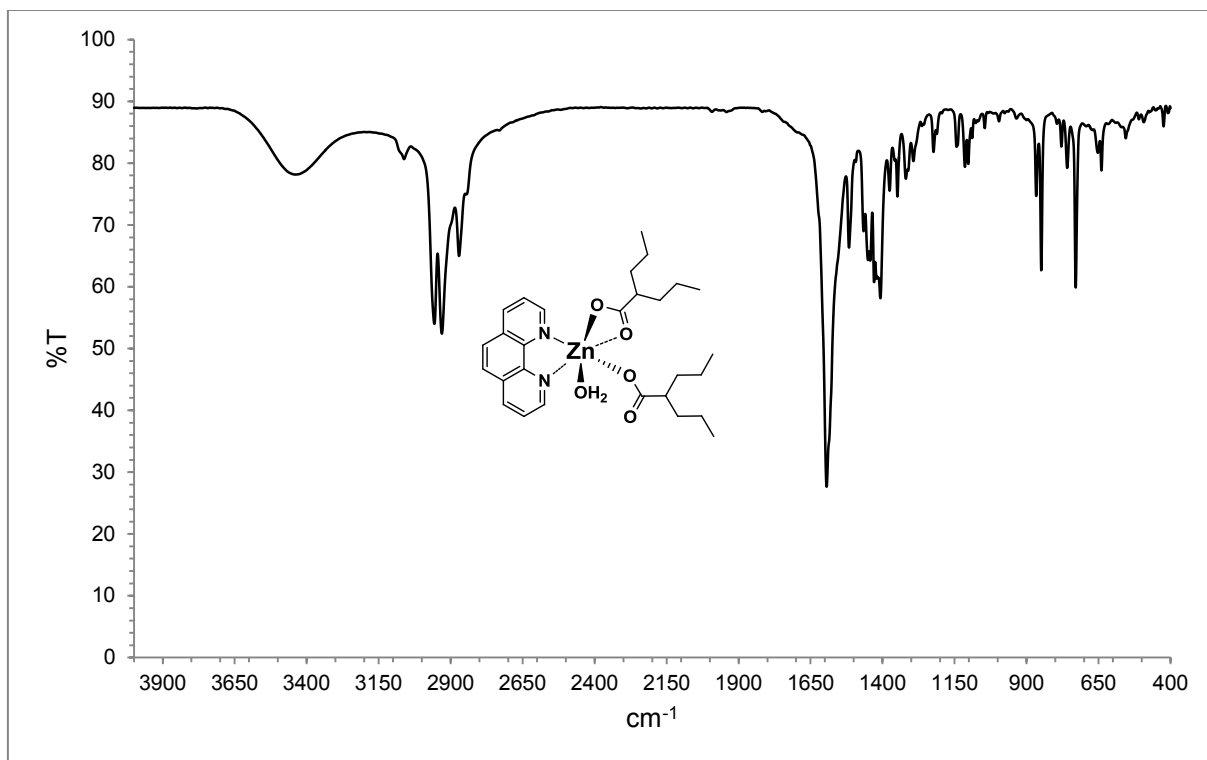
Figura 24 - Espectro de FTIR do complexo 4.



O grupo de bandas curtas em 3112, 3084, 3061 e 3136 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações $H-Csp^2$ do grupo 2,2-Bipy. As bandas alongadas em 2956 cm^{-1} , 2871 cm^{-1} e 2929 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metílicos do valproato, aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metilênicos das alquílicas do valproato e aos estiramentos simétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metil e metileno do valproato. O grupo de bandas alongadas localizadas entre 1610 e 1570 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações $O=Csp^2$ do grupo carbonila. O espectro evidencia a presença de grupos carbonila diferenciados, o que sugere a presença de mais de uma forma arranjo molecular com fórmula mínima $Cu(Valp)_2Bipy.H_2O$. A banda localizada em 1466 cm^{-1} corresponde à deformações angulares assimétricas das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metil e metileno. Em 1406 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $O-Csp^2-Csp^3$, o qual envolve o grupo carboxilato e o carbono α -carbonílico. A banda alongada em 773 cm^{-1} corresponde à deformação angular $H-Csp^2$ aromática fora do plano. As bandas fracas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem a impressão digital da molécula. A banda arredondada presente em 3447 cm^{-1} corresponde a uma molécula de água quimicamente ligada ao centro metálico de Cobre II.

O espectro de FTIR para o complexo 5 (Figura 25) apresentou bandas características para grupo carboxilato alifático e grupo aromático concordantes com a descrição de ABU et al., (2013).

Figura 25 - Espectro de FTIR do complexo 5.

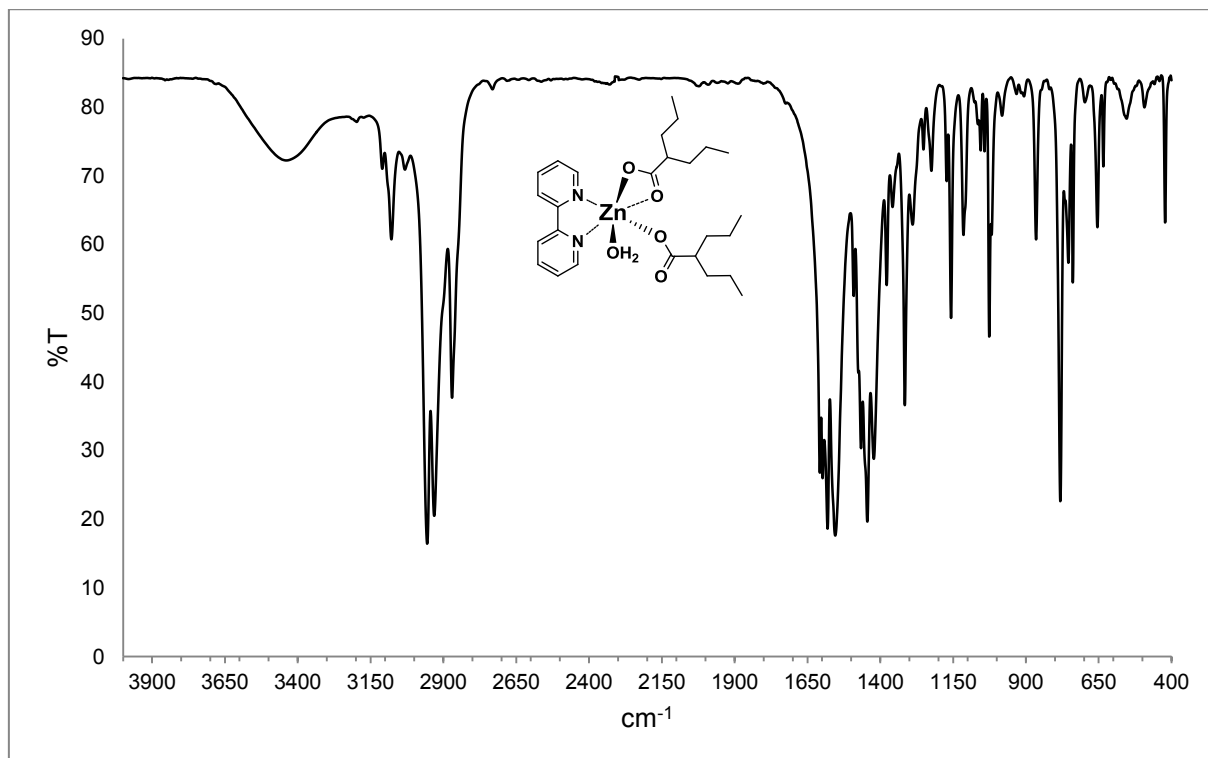


A banda curta em 3066 cm^{-1} corresponde aos estiramentos das ligações $H-Csp^2$ do grupo *1,10-Phen*. As bandas médias em 2958 cm^{-1} , 2931 cm^{-1} e 2872 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metílicos do valproato, aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metilênicos das alquílicas do valproato e aos estiramentos simétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metil e metileno do valproato. A banda correspondente ao estiramento da ligação $O=Csp^2$ grupo carbonila aparece em 1594 cm^{-1} . A banda localizada em 1452 cm^{-1} corresponde à deformações angulares assimétricas das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metil e metileno. A banda delgada em 1517 cm^{-1} compreende diferentes estiramentos das ligações Csp^2-Csp^2 dos anéis aromáticos. Em 1408 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $O-Csp^2-Csp^3$, o qual envolve o grupo carboxilato e o carbono α -carbonílico. A banda alongada em 729 cm^{-1} corresponde à deformação angular $H-Csp^2$ aromática fora do plano. As bandas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem a impressão digital da molécula. A banda arredondada presente em 3447 cm^{-1} corresponde a uma molécula de água quimicamente ligada ao centro metálico de

Zinco II, segundo análise cristalográfica realizada por ABU et al., (2013), ou água de hidratação.

O espectro de FTIR para o complexo 6 (Figura 26) apresentou semelhanças ao espectro do composto 4.

Figura 26 - Espectro de FTIR do complexo 6.



O grupo de bandas curtas em 3109, 3078 e 3032 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações $H-Csp^2$ do grupo 2,2-Bipy. As bandas alongadas em 2955 cm^{-1} , 2931 cm^{-1} e 2870 cm^{-1} correspondem respectivamente aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metílicos do valproato, aos estiramentos antissimétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metilênicos das alquílicas do valproato e aos estiramentos simétricos das ligações $H-Csp^3$ de grupos metil e metileno do valproato. O grupo de bandas alongadas localizadas entre 1607 e 1554 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações $O=Csp^2$ dos grupos carbonilas. A banda localizada em 1444 cm^{-1} corresponde à deformações angulares assimétricas das ligações $H-Csp^3$ dos grupos metil e metileno. A banda delgada em 1491 cm^{-1} compreende diferentes estiramentos das ligações Csp^2-Csp^2 dos anéis aromáticos. Em 1422 cm^{-1} corresponde à contração/alongamento do segmento $O-Csp^2-Csp^3$, o qual envolve o grupo carboxilato e o carbono α -carbonílico. A banda alongada em 781 cm^{-1} corresponde à deformação angular $H-Csp^2$ aromática fora do plano. As bandas fracas entre 1400 e 400 cm^{-1} compreendem a impressão digital da molécula. A banda arredondada presente em 3440 cm^{-1}

indica a possibilidade da existência de moléculas de água quimicamente ligadas ao centro metálico de Zinco II, segundo descrição de (LI et al., 2011), ou apenas água de hidratação.

5.3.4 Análises dos teores de Cu e Zn nos complexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6

Os teores de Cu e Zn para todos complexos foram obtidos por FAAS. Os desvios expressos na Tabela 6 foram calculados por correlação entre os valores experimentais os valores teóricos dos teores de metais baseados nas massas molares dos complexos.

Tabela 6 - Teores de Cobre e Zinco determinados por FAAS para todos os complexos.

Complexo	Cu (% m/m)			Zn (% m/m)		
	Experimental	Teórico	Desvio	Experimental	Teórico	Desvio
$Cu_2(Valp)_4$ (1)	17,82	18,16	-1,87			
$Zn_2(Valp)_4$ (2)				18,19	18,59	-2,15
$Cu(Valp)_2(1,10-Phen)$ (3)	12,05	11,99	+0,50			
$Cu(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (4)	13,22	12,02	+9,98			
$Zn(Valp)_2(1,10-Phen).H_2O$ (5)				11,29	11,89	-5,04
$Zn(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (6)				12,09	12,43	-2,73

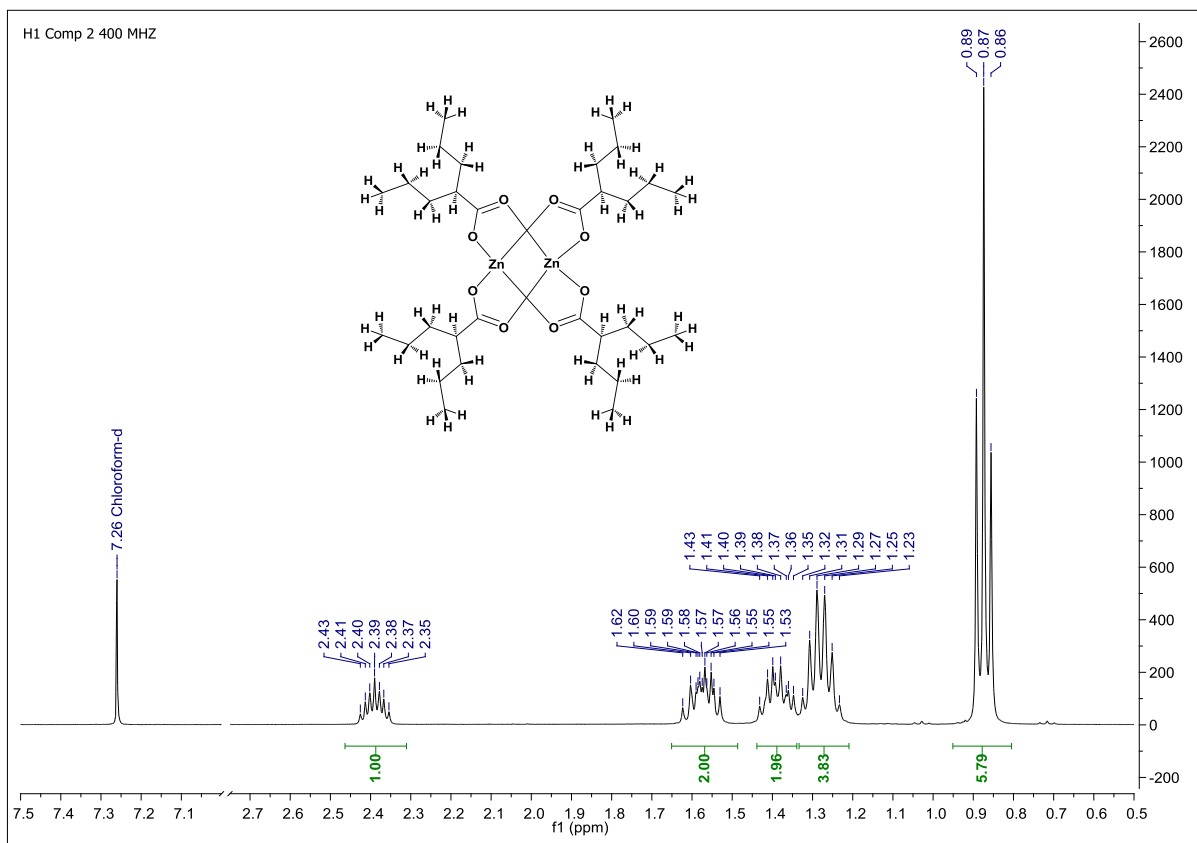
Os teores de metais nas amostras corroboram com as estimativas feitas a partir das fórmulas moleculares idealizadas para cada composto. Os desvios observados podem ser decorrentes de erros acumulados durante as etapas de execução da técnica, visto que a FAAS envolve pesagem, transferência de sólido, digestão, transferência de líquido, diluição e análise. Um fator de desvio da idealidade pode ser resultado da presença de impurezas de síntese que cristalizam em conjunto com o produto. Outro fator reside na formação de arranjos cristalinos com graus de hidratação diferentes dos valores citados em literaturas de referência. Ressalta-se que as técnicas de síntese e cristalização de complexos organometálicos são altamente sensíveis à alterações do meio.

5.3.5 Análise dos espectros de 1H RMN e ^{13}C RMN

Os espectros de RMN foram analisados e editados com auxílio do software MestReNova[©] versão 6.0.2-5475.

5.3.5.1 Análise dos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN para o complexo 2

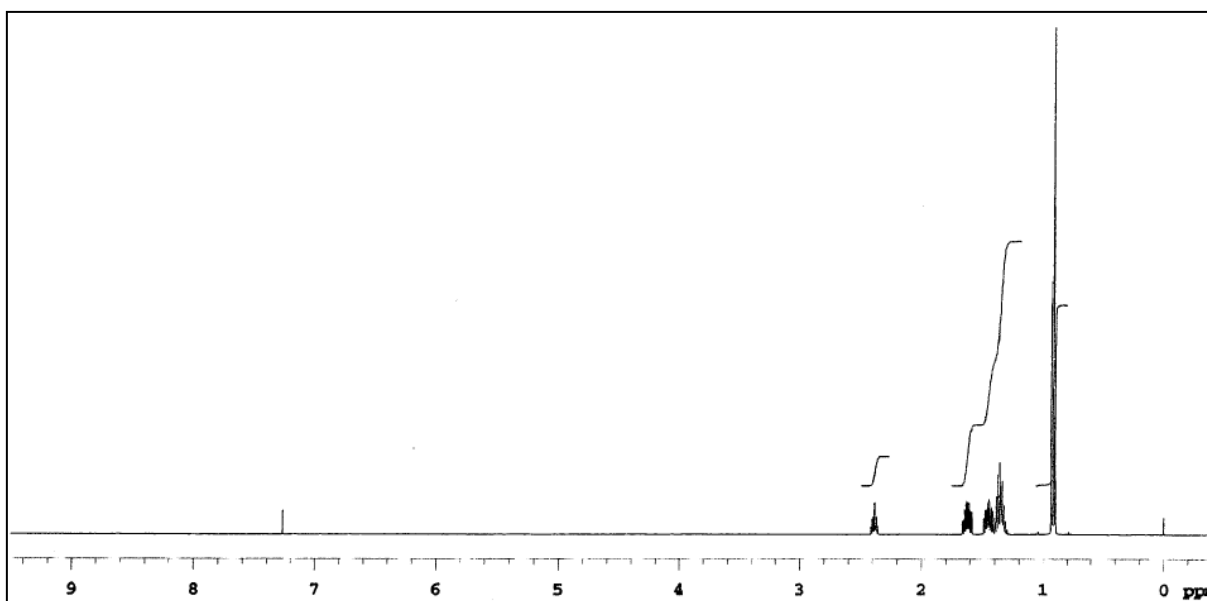
Figura 27 - Espectro de ^1H RMN do complexo 2.



Os sinais compreendidos entre δ 0,8 e 2,4 ppm são característicos para hidrogênios alquílicos (SILVERSTEIN & WEBSTER, 1998). O tripleto posicionado em δ 0,87 ppm ($J = 8$ Hz) é correspondente aos seis hidrogênios metílicos simétricos δ -carbonílicos do grupo valproato acoplados aos hidrogênios γ -carbonílicos. O sextuplete presente em δ 1,28 ppm ($J = 8$ Hz) corresponde aos quatro hidrogênios metilênicos simétricos γ -carbonílicos do grupo valproato acoplados aos hidrogênios metílicos δ -carbonílicos e os hidrogênios metilênicos β -carbonílicos. Os quatro hidrogênios β -carbonílicos são atribuídos aos dois multipletos em δ 1,39 e δ 1,57 ppm. Estes acoplam com os hidrogênios metilênicos γ -carbonílicos e o hidrogênio metínico α -carbonílico. O desdobramento do sinal pode ser atribuído ao fato de que os grupos metilênicos β -carbonílicos encontram-se distribuídos espacialmente em ambientes químicos diferentes, embora o grupo valproato possua um plano de simetria (Figura 27). O multiplete posicionado em δ 2,39 ppm ($J = 4,7$ Hz) corresponde ao hidrogênio metínico α -carbonílico acoplado aos hidrogênios metilênicos β -carbonílicos. A contagem total de hidrogênios por integração das áreas dos picos corresponde ao número total de hidrogênios

presentes no grupo valproato. O espectro de ^1H RMN para o complexo 2 (Figura 27) apresentou deslocamentos químicos δ , desdobramentos de sinal e constantes de acoplamento J que corroboram com a descrição de ABU et al., (2013) para síntese e análise similar. O espectro de ^1H RMN para o composto 2 corresponde ao mesmo padrão espectral e deslocamentos δ obtido por PELLERITO et al., 2013 e KOSHIKARI et al., 2012 para o AVP puro obtido em 500 MHz (Figura 28), o qual indica pouca influência do Zn^{+2} nos deslocamentos dos núcleos de ^1H .

Figura 28 - Espectro de referência de ^1H RMN para o AVP obtido em 500 MHz.



Fonte: KOSHIKARI et al., 2012.

Os sinais de ^{13}C para o complexo 2 (Figura 29) apresentam simetria entre os dois grupos n-propil da molécula de valproato. Os dois carbonos δ -carbonílicos aparecem deslocados em δ 14,01 ppm. Em caso similar, os pares simétricos de carbonos γ e β -carbonílicos aparecem deslocados em δ 20,65 e δ 35,09 ppm, respectivamente. O carbono α -carbonílico aparece em δ 47,49 ppm. O carbono da carboxila aparece em δ 186,26 ppm. A ausência de duplicidade nos sinais do carbono da carboxila e do carbono α -carbonílico evidencia a presença de um elemento de simetria de ligação dos grupos carboxilato com o átomo de zinco central, visto que a estequiometria do complexo tem razão metal:ligante 1:2. O espectro de ^{13}C RMN para o complexo 2 não apresenta diferença quando comparado ao espectro de ^{13}C RMN para o AVP puro (Figura 30), fator que indica pouca influência do átomo de Zn^{+2} nos deslocamentos químicos δ dos núcleos de ^{13}C do grupo valproato.

Figura 29 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo 2.

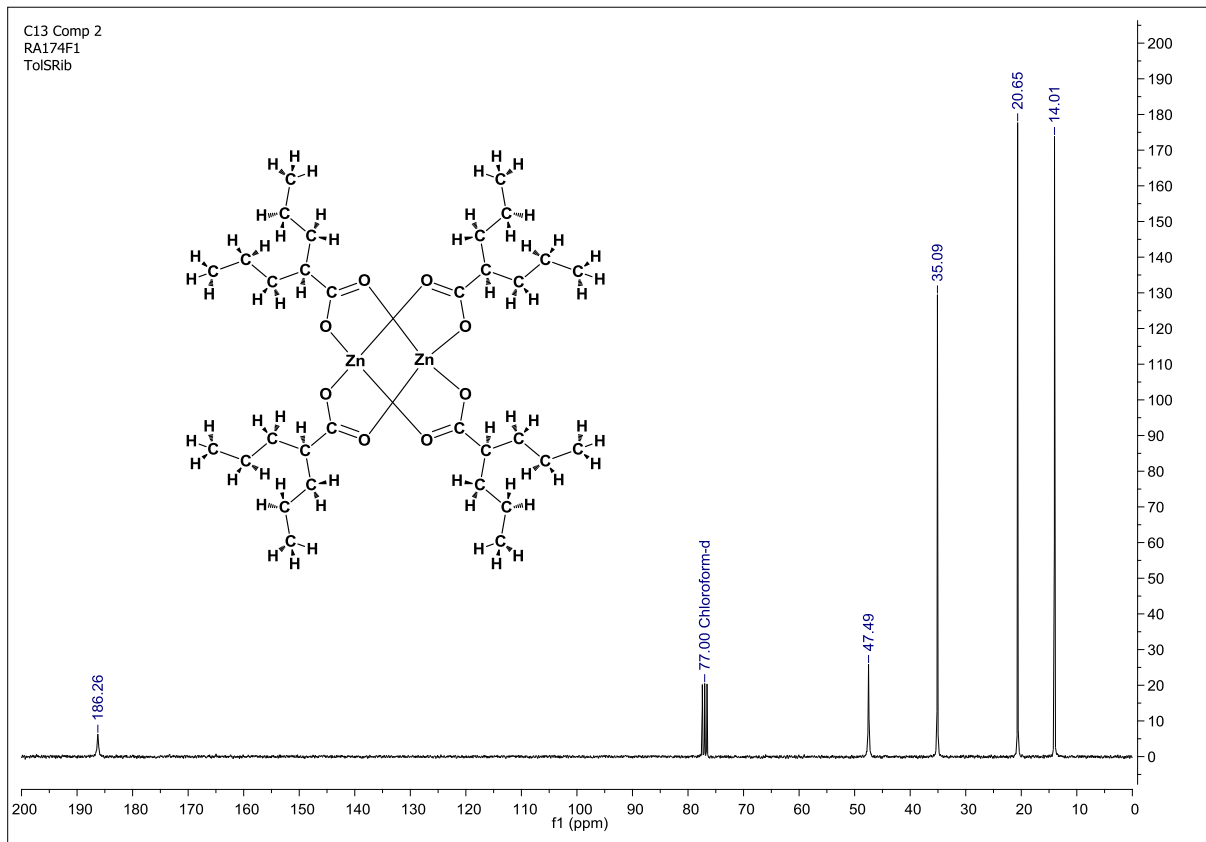
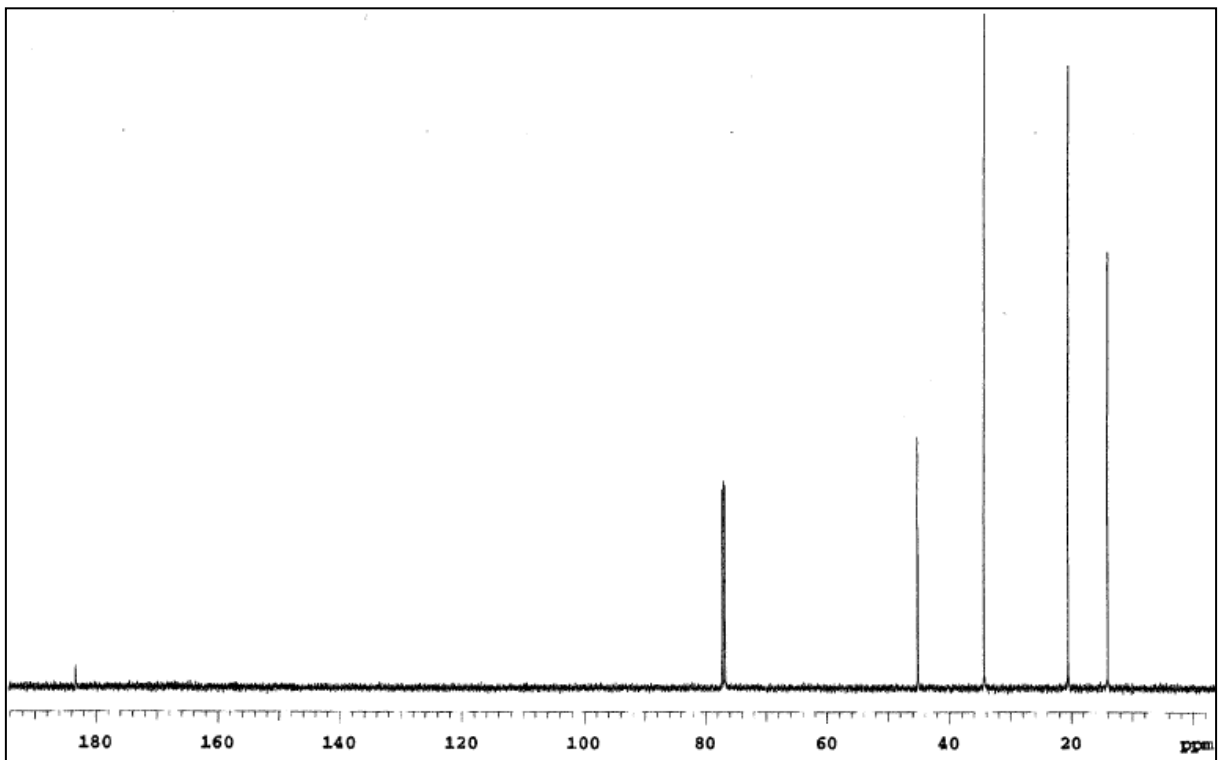


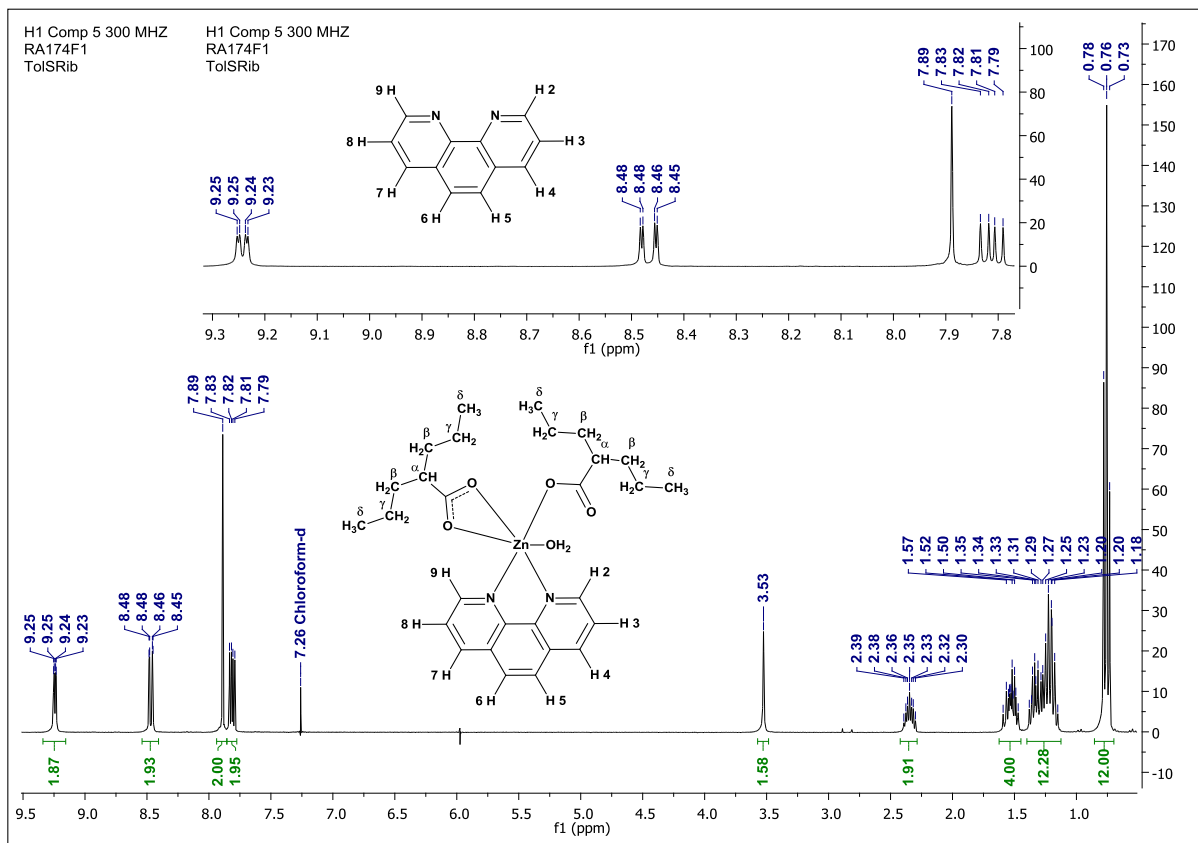
Figura 30 - Espectro de referência de ^{13}C RMN para o AVP obtido em 125 MHz.



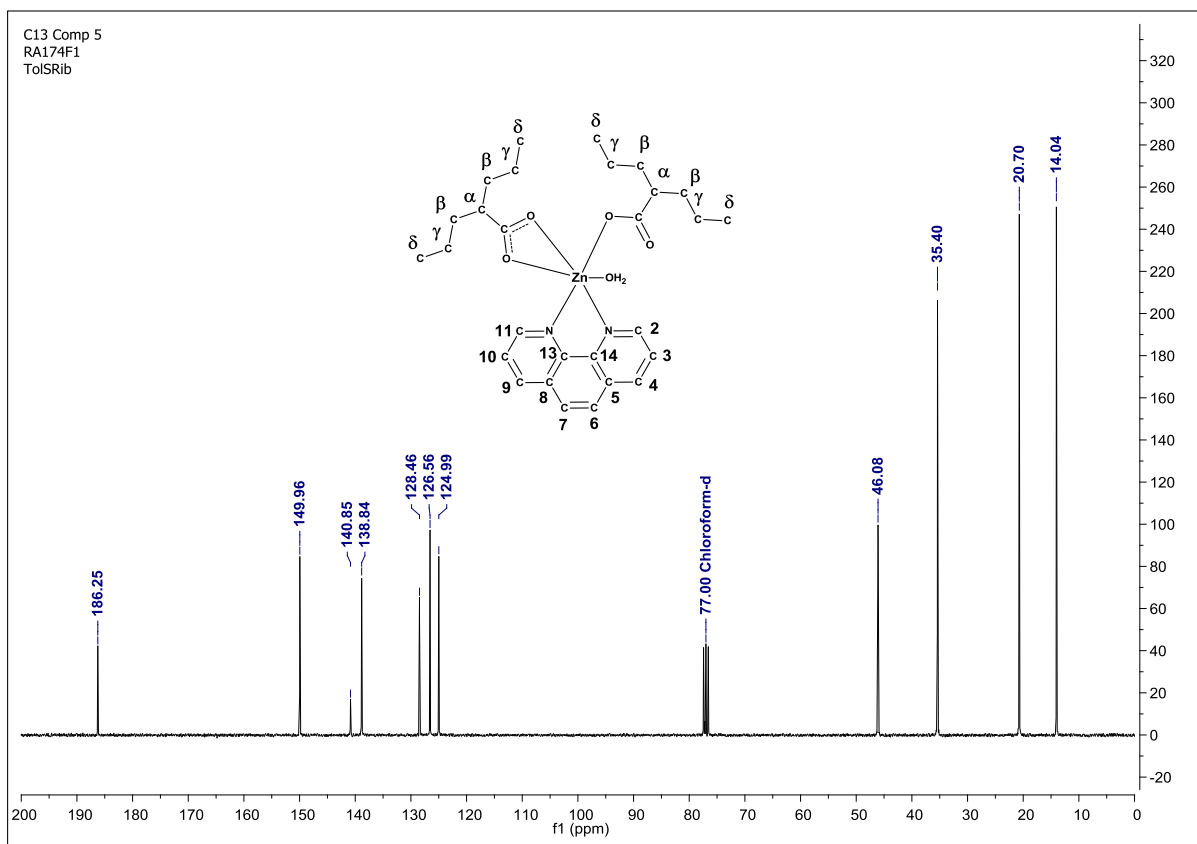
Fonte: KOSHIKARI et al., 2012.

5.3.5.2 Análise dos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN para o complexo 5

Figura 31 - Espectro de ^1H RMN do complexo 5.

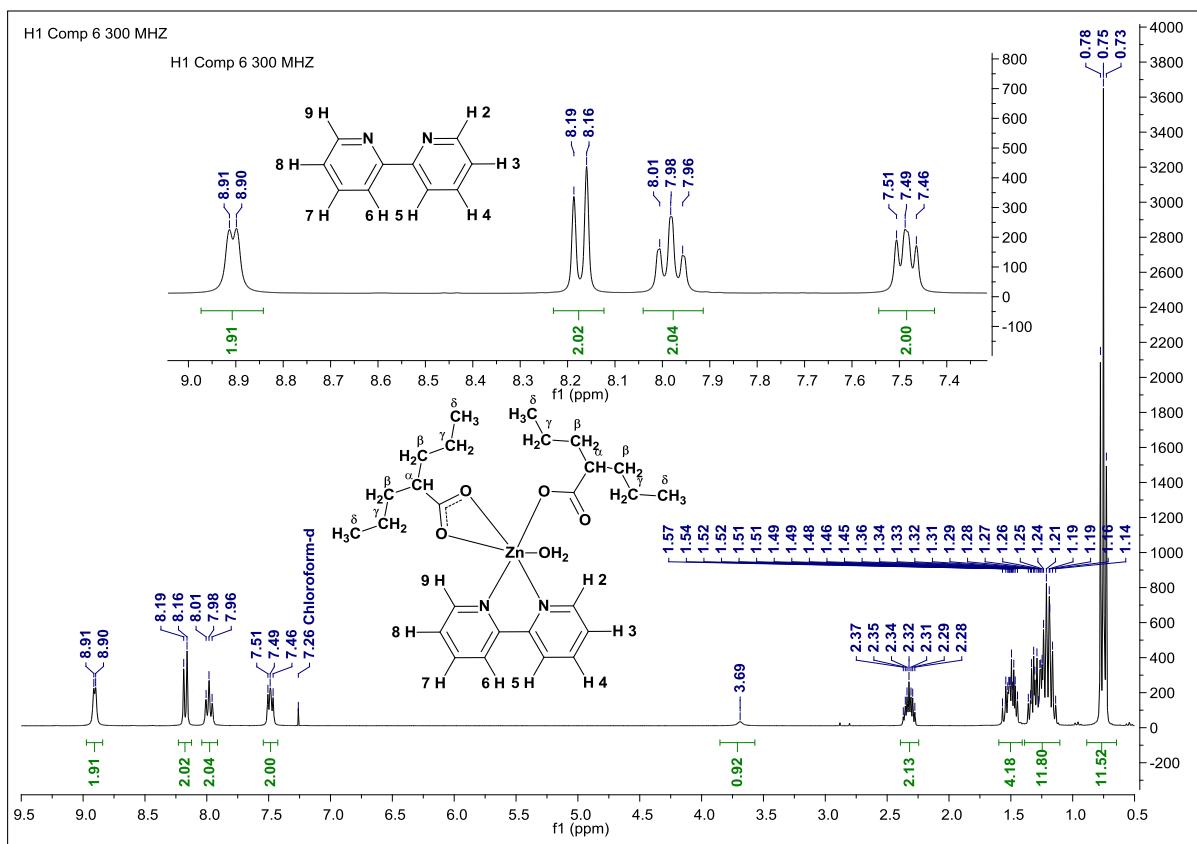


Os sinais compreendidos entre δ 0,8 e 2,35 ppm são característicos para hidrogênios alquílicos e coincidem com os deslocamentos e desdobramentos de sinais observados na Figura 27 para o grupo valproato. A integração dos sinais para os hidrogênios do grupo valproato também mantém a proporção estequiométrica metal:ligante 1:2. O singlete presente em δ 3,53 ppm corresponde a hidrogênios de moléculas de água. Os sinais presentes entre δ 7,81 e δ 9,24 ppm correspondem a hidrogênios do grupo aromático 1,10-Phen. O pico desdobrado localizado em δ 7,81 ppm corresponde a um dubleto de dubletos ($J = 8,19$ Hz) correspondente aos hidrogênios 3 e 8. O singlete localizado em δ 7,89 ppm corresponde aos hidrogênios simétricos 5 e 6. Os picos localizados em δ 8,47 ppm corresponde a um dubleto de dubletos equivalentes aos hidrogênios 4 e 7. As constantes de acoplamento $J = 8,16$ e $1,53$ Hz correspondem ao acoplamento entre os hidrogênios 4 – 3 e 7 – 8. Os picos localizados em δ 9,24 ppm correspondem a um dubleto de dubletos correspondentes aos hidrogênios simétricos 2 e 9. As constantes de acoplamento $J = 4,71$ e $1,44$ Hz correspondem ao acoplamento entre os hidrogênios 2 – 3 e 9 – 8.

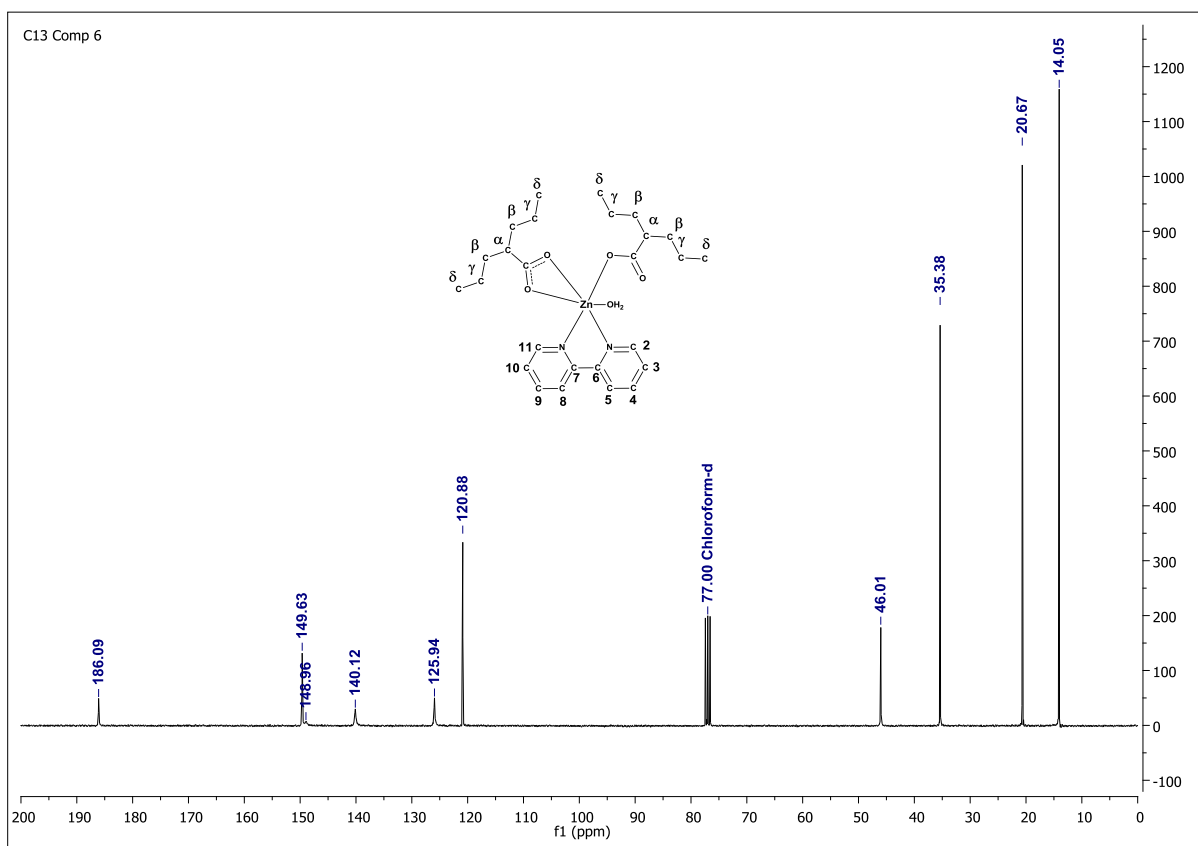
Figura 32 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo 5.

Os sinais de ^{13}C para o complexo 5 (Figura 32) apresentam a simetria esperada entre os dois grupos n-propil da molécula de valproato. Os carbonos δ -carbonílicos aparecem deslocados em δ 14,04 ppm. Em caso similar, os pares simétricos de carbonos γ e β -carbonílicos aparecem deslocados em δ 20,70 e δ 35,40 ppm, respectivamente. Os carbono α -carbonílico aparece em δ 46,08 ppm. Os carbonos dos grupos carboxilatos aparecem em δ 186, 25 ppm. Os sinais presentes entre δ 124 e δ 149 ppm correspondem aos carbonos do sistema aromático do grupo 1,10-fenatrolina. A presença de apenas seis picos correspondentes a doze carbonos dentro deste intervalo confirma a presença de um plano de reflexão como operação de simetria que divide o grupo 1,10-Phen em duas metades equivalentes. Os respectivos sinais localizados em δ 124,99, δ 126,58, δ 128,46, δ 138,84, δ 140,85 e δ 149,96 ppm correspondem aos respectivos pares de carbonos simétricos 3 – 10, 6 – 7, 5 – 8, 4 – 9, 13 – 14 e 2 – 11. Ao se realizar as operações de simetria dos grupos valproato e do grupo 1,10-fenatrolina, evidencia-se que a contagem total dos picos corresponde ao número total de carbonos esperados para a estrutura molecular idealizada na Figura 16.

5.3.5.3 Análise dos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN para o complexo 6

Figura 33 - Espectro de ^1H RMN do complexo 6.

Os sinais compreendidos entre δ 0,75 e 2,32 ppm são característicos para hidrogênios alquílicos e coincidem com os deslocamentos e desdobramentos de sinais observados na Figura 27 para o grupo valproato. A integração dos sinais para os hidrogênios do grupo valproato também mantém a proporção estequiométrica metal:ligante 1:2. O singlete presente em δ 3,69 ppm corresponde a hidrogênios de moléculas de água. Os sinais presentes entre δ 7,49 e δ 8,91 ppm correspondem a hidrogênios do grupo aromático 2,2-Bipy. O pico desdobrado localizado em δ 7,49 ppm corresponde a dois tripletos sobrepostos ($J = 6,28$ Hz) correspondente aos hidrogênios 3 – 8 acoplados com 2 – 4 e 7 – 9. O pico localizado em δ 7,96 ppm corresponde a dois tripletos sobrepostos ($J = 6$ Hz) decorrentes dos acoplamentos do hidrogênio 4 com os hidrogênios 3 – 5 e do hidrogênio 7 com os hidrogênios 6 – 8. O dubleto localizado em δ 8,19 ppm corresponde aos hidrogênios 5 e 6 acoplados com os hidrogênios simétricos 4 e 7. O dubleto localizado em δ 8,90 ppm corresponde aos hidrogênios 2 e 9 ($J = 3$) acoplados com os hidrogênios 3 e 8 respectivamente.

Figura 34 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo 6.

Os sinais de ^{13}C para o complexo 6 (Figura 34) apresentam simetria entre os dois grupos n-propil da molécula de valproato. Os carbonos δ -carbonílicos aparecem deslocados em δ 14,05 ppm. Em caso similar, os pares simétricos de carbonos γ e β -carbonílicos aparecem deslocados em δ 20,67 e δ 35,38 ppm, respectivamente. Os carbono α -carbonílico aparece em δ 46,01 ppm. Os carbonos dos grupos carboxilatos aparecem em δ 186,09 ppm. Os sinais presentes entre δ 120 e δ 149 ppm correspondem aos carbonos do sistema aromático do grupo 2,2-bipiridina. A presença de apenas cinco picos correspondentes a dez carbonos dentro deste intervalo confirma a presença de um plano de reflexão como operação de simetria que divide o grupo 2,2-bipiridina em duas metades equivalentes. Os respectivos sinais localizados em δ 120,88, δ 125,94, δ 140,12, δ 148,96, e δ 149,63 ppm correspondem aos respectivos pares de carbonos simétricos 5 – 8, 3 – 10, 4 – 9, 2 – 11, e 6 – 7. Ao se realizar as operações de simetria dos grupos valproato e do grupo 2,2-bipiridina, evidencia-se que a contagem total dos picos corresponde ao número total de carbonos esperados para a estrutura molecular idealizada na Figura 16.

5.3.6 Análise dos espectros de massas

Os espectros de massas obtidos por HD-MS foram analisados com auxílio do software Bruker Daltonics Compass DataAnalysis 4.0. As propostas para as possíveis fórmulas moleculares correspondentes aos valores de m/z , assim como os valores dos erros em torno dos valores verdadeiros foram obtidos com auxílio da ferramenta eletrônica ChemCalc, disposta no endereço eletrônico www.chemcalc.org. Foram consideradas apenas as fórmulas moleculares com erro de $m/z \pm 5,0$ ppm em torno do valor verdadeiro.

5.3.6.1 Análise do espectro de massas do composto 3

O espectro de massas para o composto $Cu(Valp)_2(1,10-Phen)$ (3) (Figura 35) apresentou formações intensas de íons formados a partir de rearranjos de fragmentos sem a presença do átomo de cobre. Para tanto, estes sinais mais intensos não puderam ser identificados. Os íons correspondentes às fragmentações da molécula apresentaram intensidades baixas, porém a identificação foi possível pela avaliação da distribuição monoisotópica do cobre (Tabela 7), tendo como parâmetro o pico base com intensidade de 100%. O íon molecular pode ser observado em baixa intensidade como um aduto de potássio 39 (M+K) em m/z 568,1759. Pode-se observar também a íons oriundos da fragmentação molecular e rearranjos iônicos por recombinação de fragmentos.

Figura 35 - Espectro de massas para $Cu(Valp)_2Phen$ (3) com a distribuição monoisotópica para o íon $C_{24}H_{16}N_4Cu^+$.

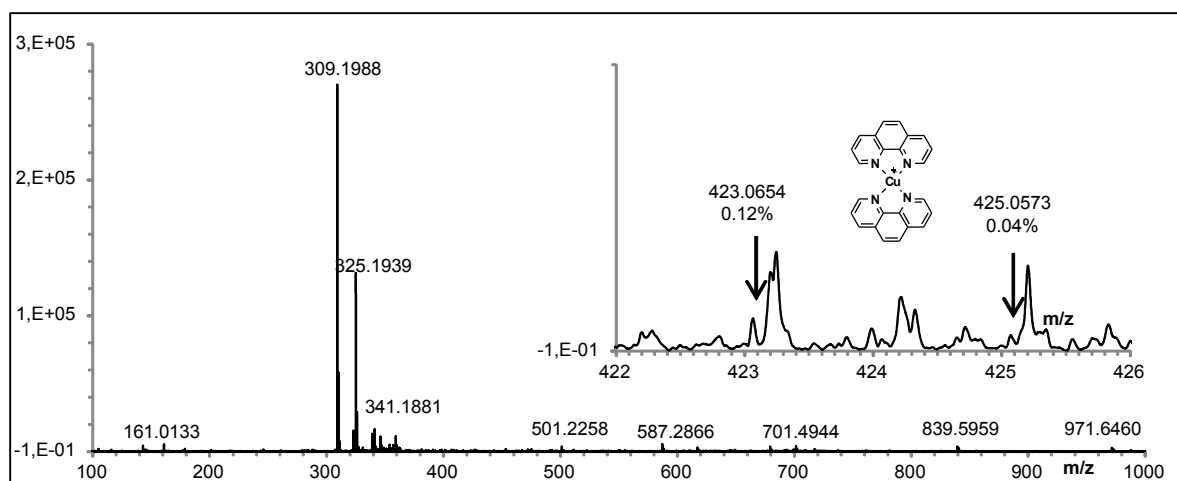
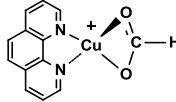
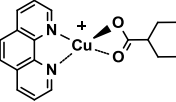
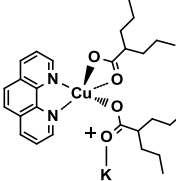
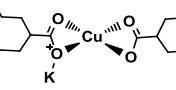
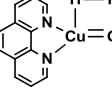
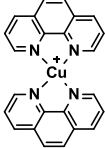


Tabela 7 - Fragmentos de massas para o complexo 3.

Fórmula/Íon	Estrutura	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> (Distribuição monoisotópica do Cu)	Erro (ppm)
C ₁₃ H ₉ N ₂ O ₂ Cu [M - C ₁₅ H ₃₀ O ₂] ⁺		287,9971	287,9971 (0,11%) 289,9963 (0,06%)	3,91
C ₂₀ H ₂₃ N ₂ O ₂ Cu [M - Valp] ⁺		386,1066	386,1066 (0,06%) 388,1080 (0,04%)	2,91
C ₂₈ H ₃₈ N ₂ O ₄ CuK [M + K] ⁺		568,1759	568,1759 (0,03%) 570,1780 (0,01%)	0,97
C ₁₆ H ₃₀ O ₄ CuK [Cu(Valp) ₂ + K] ⁺		388,1081	388,1081 (0,04%)	0,93
C ₁₂ H ₁₀ N ₂ OCu [Cu(1,10-phen)OH ₂] ⁺		261,0081	261,0081 (0,21%) 263,0042 (0,09%)	3,18
C ₂₄ H ₁₆ N ₄ Cu [Cu(1,10-phen) ₂] ⁺		423,0654	423,0654 (0,12%) 425,0573 (0,04%)	4,00

A baixa intensidade dos sinais correspondentes aos íons com carga unitária contendo o átomo de cobre com nox 2+ pode ser decorrente da redução do cobre na fonte. A presença de metanol como solvente (álcool redutor) e a configuração da fonte de ESI (presença de gás inerte, potencial negativo atrativo) contribuem para a formação de um ambiente redutor para o cobre. Além disso, elétrons livres presentes no gás aquecido produzem descarga de corona, a qual pode produzir o Cu⁺ por redução galvânica (MORAES & LAGO, 2003). Este fenômeno pode ser observado ao avaliar-se o sinal em *m/z* 423,0654, onde se observa a formação de um íon com átomo de cobre com nox 1+. A diferença de potencial (ddp) redox entre as espécies estáveis Cu²⁺ e Cu⁺ é de + 0,153 V, quando comparada com a ddp redox entre as espécies estáveis Zn²⁺ e Zn⁰, que é de - 0,762 V (LIDE, 2003). O átomo de cobre reduzido contribui para a formação de espécies organometálicas neutras e fragmentos orgânicos oxidados na fonte.

5.3.6.2 Análise do espectro de massas do composto 4

O espectro de massas para o composto $Cu(Valp)_2(2,2-bipy).H_2O$ (4) (Figura 36) apresentou formações intensas de íons formados a partir de rearranjos de fragmentos sem a presença do átomo de cobre. Para tanto, estes sinais mais intensos não puderam ser identificados. Os íons correspondentes às fragmentações da molécula apresentaram intensidades baixas, porém a identificação foi possível pela avaliação da distribuição monoisotópica do cobre (Tabela 8).

Figura 36 - Espectro de massas para $Cu(Valp)_2Bipy.H_2O$ (4) com a distribuição monoisotópica para o íon $C_{18}H_{23}N_2O_2Cu^+$.

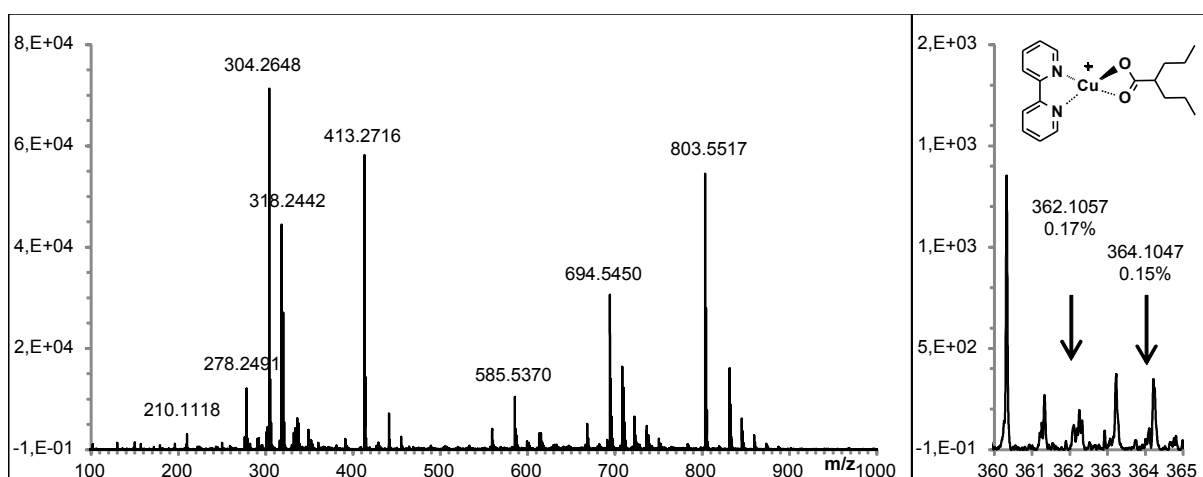


Tabela 8 - Fragmentos de massas para o complexo 4.

Fórmula/Íon	Estrutura	m/z	m/z (Distribuição monoisotópica do Cu)	Erro (ppm)
$C_{18}H_{23}N_2O_2Cu$ [M – Valp] ⁺		362,1057	362,1057 (0,17%) 364,1047 (0,15%)	0,41

5.3.6.3 Análise do espectro de massas do composto 5

O espectro de massas para o composto $Zn(Valp)_2(1,10\text{-phen}).H_2O$ (5) (Figura 37) apresentou sinais intensos de íons formados a partir de fragmentos moleculares com a presença do átomo de zinco. Os sinais mais intensos correspondem a íons derivados da fragmentação molecular simples, rearranjos ou adutos (Tabela 9). Para a análise espectral, o íon molecular foi considerado sem a molécula de água, pelo fato de que moléculas de água de hidratação são eliminadas por desorção durante a ionização na fonte. O íon molecular foi obtido como um aduto de próton (M+H) com m/z 531,2196. Obtiveram-se íons oriundos da fragmentação molecular em m/z 387,1064, 288,9958 e 181,0773, de rearranjos moleculares com carga unitária em m/z 567,1757 e 469,0657, e rearranjos moleculares com carga dupla em m/z 212,0339 e 302,0685. Salienta-se a manutenção do nox 2+ do átomo de zinco em todos os íons identificados, tese que corrobora com a observação feita no item 5.3.6.1.

Figura 37 - Espectro de massas para $Zn(Valp)_2Phen.H_2O$ (5) com a distribuição monoisotópica para o íon $C_{20}H_{23}N_2O_2Zn^+$.

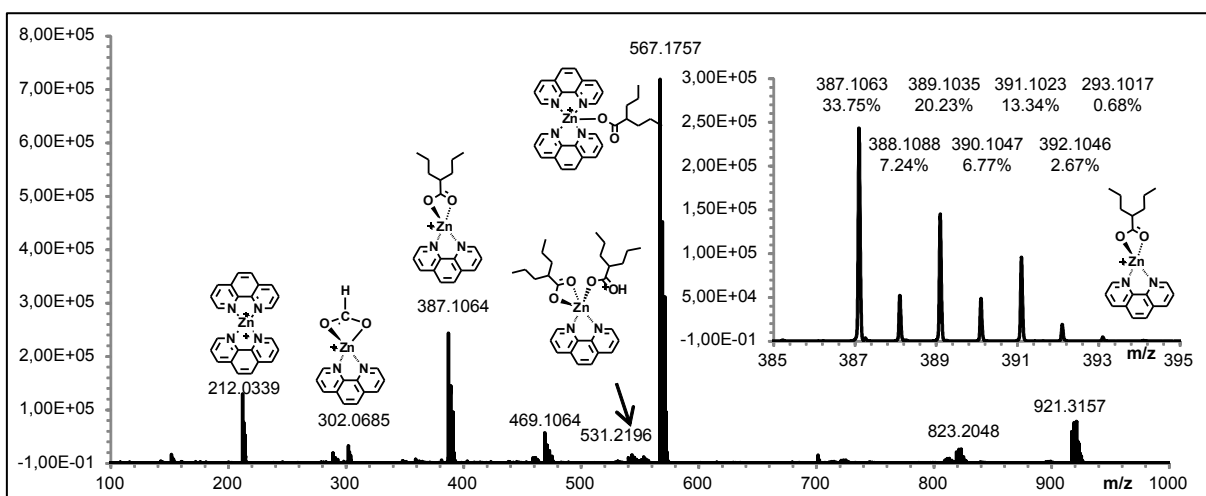


Tabela 9 - Fragmentos de massas para o complexo 5.

Fórmula/Íon	Estrutura	m/z	m/z (Distribuição isotópica do Zn)	Erro (ppm)
$C_{28}H_{39}N_2O_4Zn$ [M+1H] ⁺		531,2196	531,2196 (0,62%) 532,2227 (0,22%) 533,2176 (0,36%) 534,2151 (0,18%) 535,2159 (0,25%) 536,2154 (0,08%) 537,2170 (0,04%)	0,92
$C_{20}H_{23}N_2O_2Zn$ [M - Valp] ⁺		387,1064	387,1063 (33,75%) 388,1088 (7,24%) 389,1035 (20,23%) 390,1047 (6,77%) 391,1023 (13,34%) 392,1046 (2,67%) 393,1017 (0,68%)	3,24
$C_{13}H_9N_2O_2Zn$ [M - C ₁₅ H ₃₀ O ₂] ⁺		288,9958	288,9958 (2,76%) 289,9988 (0,44%) 290,9929 (1,47%) 291,9944 (0,45%) 292,9917 (0,97%) 293,9941 (0,14%) 294,9912 (0,05%)	1,09
$C_{32}H_{31}N_4O_2Zn$ [Zn(1,10-phen) ₂ Valp] ⁺		567,1757	567,1757 (100,00%) 568,1783 (35,74%) 569,1733 (63,06%) 570,1751 (29,36%) 571,1718 (43,36%) 572,1734 (13,34%) 573,1744 (2,86%) 573,1766 (0,55%)	3,30
$C_{25}H_{17}N_4O_2Zn$ [Zn(1,10-phen) ₂ CO ₂ +H] ⁺		469,0657	469,0657 (7,88%) 470,0674 (2,20%) 471,0628 (4,78%) 472,0644 (1,84%) 473,0613 (3,24%) 474,0642 (0,82%) 475,0637 (0,23%) 476,0679 (0,04%)	2,94
$C_{24}H_{16}N_4Zn$ [Zn(1,10-phen) ₂] ⁺²		212,0339	212,0338 (17,96%) 212,5352 (5,00%) 213,0324 (10,60%) 213,5331 (4,19%) 214,0316 (7,37%) 214,5326 (1,86%) 215,0330 (0,48%) 215,5369 (0,08%)	2,59
$C_{36}H_{24}N_6Zn$ [Zn(1,10-phen) ₃] ⁺²		302,0685	302,0685 (4,55%) 302,5694 (1,76%) 303,0666 (2,83%) 303,5680 (1,46%) 304,0661 (2,01%) 304,5671 (0,78%) 305,0611 (0,21%)	2,60
$C_{12}H_9N_2$ [1,10-phen + 1H] ⁺		181,0773	-	4,19

5.3.6.4 Análise do espectro de massas do composto 6

O espectro de massas para o composto inédito $Zn(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$ (6) (Figura 38) apresentou formações intensas de íons formados a partir de fragmentos moleculares com a presença do átomo de zinco, em um padrão de fragmentação similar ao obtido para o composto 5 (item 5.3.6.3). Os sinais mais intensos correspondem a íons derivados da fragmentação molecular simples, rearranjos ou adutos (Tabela 10). Para a análise espectral, o íon molecular foi considerado sem a molécula de água pelo fato de que moléculas de água de hidratação são eliminadas por desorção durante a ionização na fonte. O íon molecular foi obtido como um aduto de próton ($M+H$) com m/z 507,2207. Obtiveram-se íons oriundos da fragmentação molecular em m/z 363,1069, 264,9964 e 157,0765, de rearranjos moleculares com carga unitária em m/z 519,1759, e rearranjos moleculares com carga dupla em m/z 188,0388. Salienta-se também a manutenção do nox 2+ do átomo de zinco em todos os íons identificados, tese que corrobora com a observação feita no item 5.3.6.1.

A obtenção do íon molecular para o composto 6 corrobora com a fórmula molecular hipotética idealizada para este composto inédito (item 4.2.2).

Figura 38 - Espectro de massas para $Zn(Valp)_2Bipy.H_2O$ (6) com distribuição monoisotópica para o íon $C_{26}H_{39}N_2O_4Zn^+$.

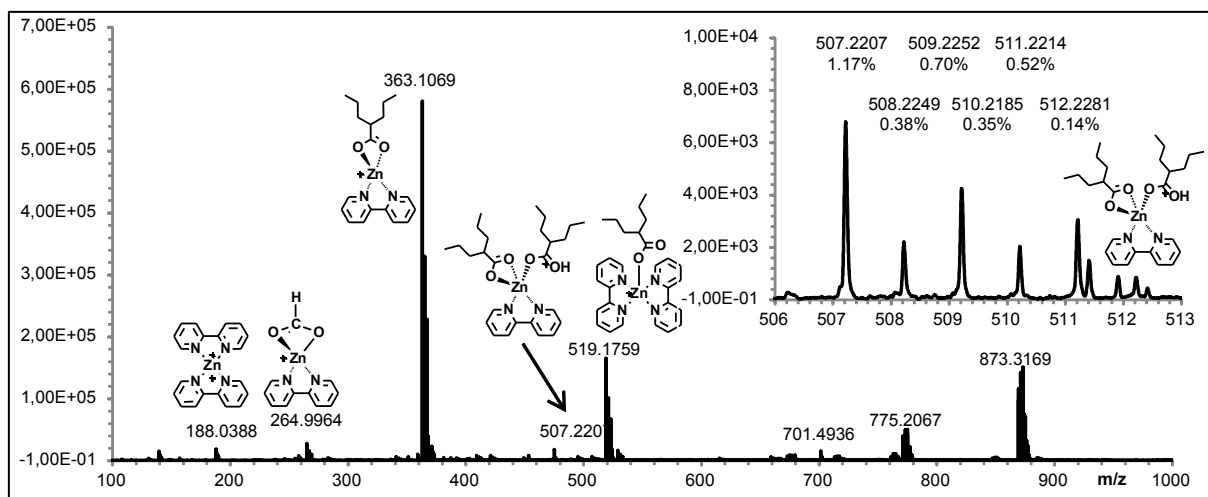


Tabela 10 - Fragmentos de massas para o complexo 6.

Fórmula/Ion	Estrutura	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> (Distribuição isotópica do Zn)	Erro (ppm)
$C_{26}H_{39}N_2O_4Zn$ [M+1H] ⁺		507,2207	507,2207 (1,17%) 508,2249 (0,38%) 509,2252 (0,70%) 510,2185 (0,35%) 511,2214 (0,52%) 512,2281 (0,14%)	1,21
$C_{18}H_{23}N_2O_2Zn$ [M - Valp] ⁺		363,1069	363,1069 (100,00%) 364,1090 (19,69%) 365,1039 (56,73%) 366,1053 (19,22%) 367,1027 (39,34%) 368,1049 (6,79%) 369,1012 (1,87%) 370,1035 (0,30%)	4,95
$C_{11}H_9N_2O_2Zn$ [M - C ₁₅ H ₃₀ O ₂] ⁺		264,9964	264,9964 (4,78%) 265,9962 (0,64%) 266,9926 (2,74%) 267,9908 (0,72%) 268,9924 (1,83%) 269,9928 (0,24%) 370,9967 (0,08%)	3,38
$C_{20}H_{16}N_4Zn$ [Zn(2,2-bipy) ₂] ⁺²		188,0338	188,0338 (3,24%) 188,5352 (0,84%) 189,0323 (1,19%) 189,5332 (0,77%) 190,0315 (1,31%) 190,5329 (0,24%) 191,0371 (0,07%)	2,34
$C_{28}H_{31}N_4O_2Zn^+$ [Zn(2,2-bipy) ₂ Valp] ⁺		519,1759	519,1759 (28,48%) 520,1779 (8,53%) 521,1733 (17,45%) 522,1746 (7,05%) 523,1720 (11,59%) 524,1734 (3,21%) 525,1740 (0,90%) 526,1785 (0,15%)	4,01
$C_{10}H_9N_2$ [2,2-Bipy + 1H] ⁺		157,0765	-	0,47

5.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MIMÉTICAS DE SOD-LIKE E CAT-LIKE.

Os ensaios de Sod-like e Cat-like foram realizados com o objetivo de avaliar as possíveis atividades miméticas dos complexos 3, 4, 5 e 6 com as enzimas do grupo catalase (Cat) e superóxido dismutase (Sod). Os resultados estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11 - Atividades de Sod-like e Cat-like para os compostos 3, 4, 5 e 6.

Composto	Unidades de Sod-like		Unidades de Cat-like		
	Exp. 1	M ± SD	Exp. 1	Exp. 2	M ± SD
<i>Cu(Valp)₂Phen</i> (3)	0,00	0,00 ± 0,00	30,00	18,80	24,40 ± 7,92
<i>Cu(Valp)₂Bipy.H₂O</i> (4)	0,00	0,00 ± 0,00	33,75	26,25	30,00 ± 5,30
<i>Zn(Valp)₂Phen.H₂O</i> (5)	0,00	0,00 ± 0,00	26,30	15,00	20,65 ± 7,99
<i>Zn(Valp)₂Bipy.H₂O</i> (6)	0,00	0,00 ± 0,00	30,00	45,00	35,75 ± 10,60

5.4.1 Atividade Sod-like

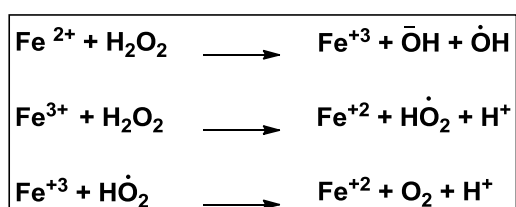
Os complexos testados não apresentaram atividade de Sod-like para o ensaio utilizado. Em estudo similar, KLANICOVÁ et al., (2012) avaliaram a atividade de Sod-like para complexos similares de *Cu(1,10-Phen)(purina)₂* no qual não observaram atividade de Sod-like, fato que corrobora com os resultados acima. Os complexos de Cu⁺² têm 2 atividade oxidante aumentada quando ligado a sistemas aromáticos removedores de elétrons, segundo KELLETT et al., (2012), porém a reação de desmutação do radical ânion superóxido a peróxido passa pela redução do Cu⁺² a Cu⁺, com o *Cu(1,10-Phen)₂* na forma catiônica. A justificativa para a ausência de atividade pode estar no fato dos complexos testados serem moléculas neutras de difícil dissociação.

5.4.2 Atividade Cat-like

A atividade de Cat-like foi positiva para o modelo proposto. Os resultados indicam não haver diferença significativa de atividade entre os análogos 3 – 5 e 4 – 6, indicando que a natureza do metal não interferiu na atividade catalítica. A principal diferença pode ser observada quando são comparadas as atividades dos complexos os ligantes *1,10-Phen* ou *2,2*

Bipy. O composto 4 apresentou uma atividade Cat-like 20% superior quando comparado com o composto 3, e o composto 6 apresentou-se 57 % mais ativo que o composto 5. A diferença na atividade *Cat-like* pode estar na diferença da natureza dos ligantes. O ligante *1,10-Phen* é um grupo removedor de elétrons por ressonância do sistema π -conjugado dos três anéis aromáticos, segundo SHRIVER, (2008), fator de dificulta a transferência de um elétron do metal para o grupo peróxido. Este fenômeno é menos pronunciado quando o ligante é *2,2-Bipy*, o qual é composto por um sistema com dois anéis aromáticos conjugados. Para que a reação aconteça, o metal deve estar em um ambiente químico que favoreça a transferência de um elétron para a espécie H_2O_2 . Segundo DÍAZ et al., (2012) o mecanismo catalítico da catalase é similar à reação de Fenton, a qual envolve um mecanismo redox iniciado pela oxidação do metal (Figura 39).

Figura 39 - Esquema do mecanismo da Reação de Fenton, análogo à catalase.



Fonte: AGUIAR et al., (2007).

O resultado é corroborado por outros estudos. KAR et al., (2013) reportam atividades *CAT-like* expressivas para uma série de complexos de Mn^{+2} octaédricos com ligantes derivados da piridina. Resultados similares foram reportados por PIRES et al., (2013) com um ensaio realizado com complexos polinucleares de Fe^{+2} .

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*.

O estudo da citotoxicidade aguda dos complexos testados frente à *A. salina* foi determinado em razão da média da mortalidade dos náuplios correspondentes às concentrações testadas. Os dados foram obtidos em três experimentos repetidos em dias diferentes e com quatro repetições intra-experimental. As análises de variância (Anova) para os conjuntos de dados de cada concentração foram realizados pelo programa de Assistência Estatística ASSISTAT[®], versão 7.7. O modo de cálculo utilizado foi o DIC (Experimento Inteiramente Casualizado), com aplicação do teste de Tukey.

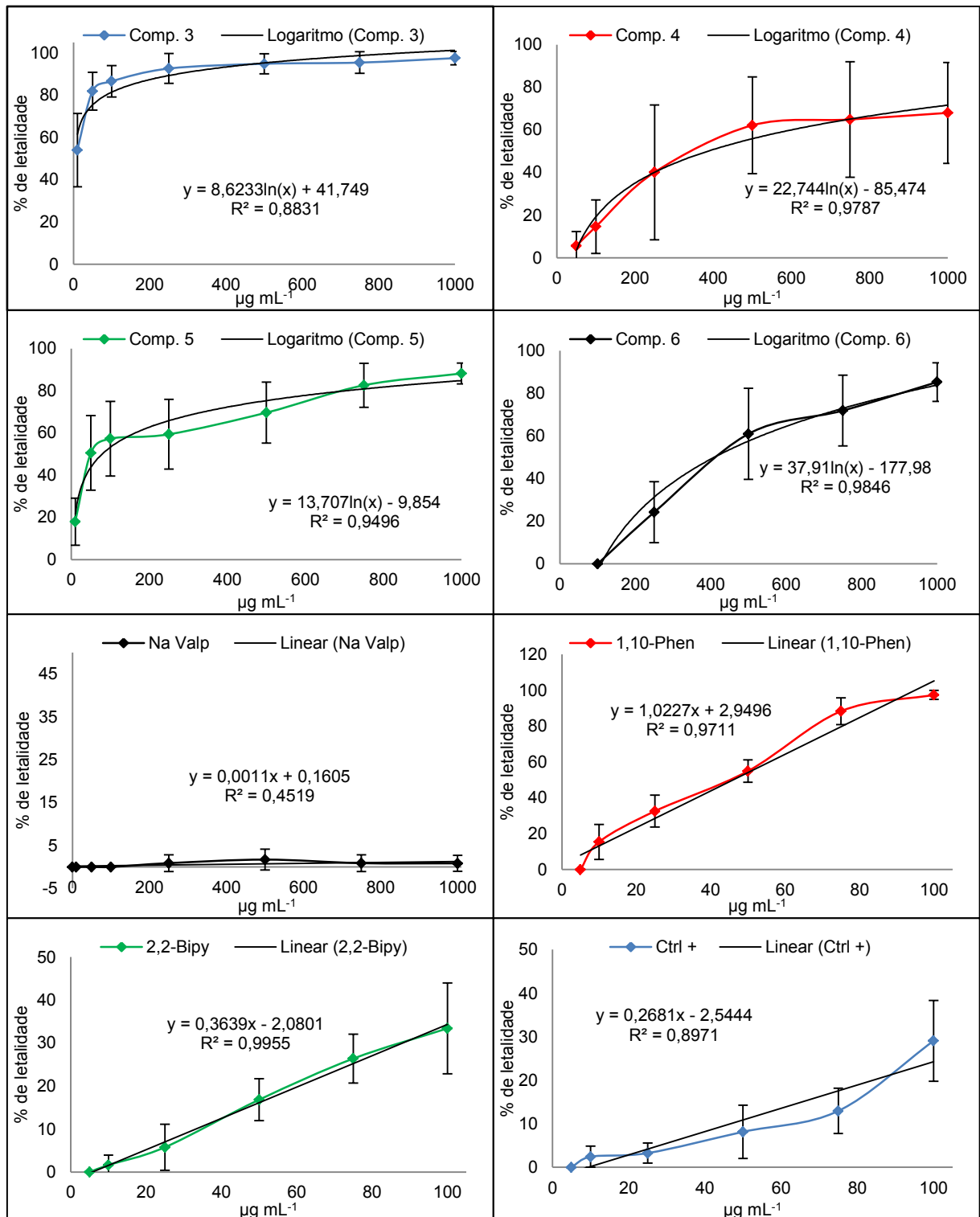
O teste de Tukey (Tabela 12) determina o intervalo de confiança da média a partir de um valor de F-crítico estipulado. O valor calculado para F deve ser menor que o valor de F-crítico para que não haja diferença significativa entre os componentes da média (NS). Valores de F maiores que o F-crítico ($0,01 < P < 0,05$) indicam 95% de probabilidade de existir diferença significativa entre os componentes da média. Valores de $P < 0,01$ indicam 99% de probabilidade de existir diferença significativa entre os componentes da média.

A existência de diferença significativa entre os pontos para a aplicação de análise de regressão também foi calculada no programa ASSISTAT[®]. Os dados das regressões foram analisados no modo “Regressão na Análise de Variância”, o qual indicou a existência de diferença significativa entre os pontos das curvas. Os gráficos de dispersão (Figura 40), assim como as respectivas curvas de tendência, as equações das curvas e os coeficientes de determinação (R^2) foram obtidos com o programa Microsoft Excel[®]. Os valores das CL_{50} correspondentes à variável x foram calculados por interpolação do valor de 50% de mortalidade ($y = 50$) às equações das curvas.

Tabela 12 - Compostos 3, 4, 5, 6 e os controles *Na Valp*, *1,10-Phen*, *2,2-Bipy* e $K_2Cr_2O_7$ testados frente a *A. salina*.

Composto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Letalidade (% Média \pm SD)
<i>Cu(Valp)</i> ₂ <i>Phen</i> (3)	1000	97,61 \pm 3,14
	750	95,49 \pm 5,10
	500	94,93 \pm 4,74
	250	92,69 \pm 7,07
	100	86,64 \pm 7,43
	50	81,97 \pm 8,91
	10	54,06 \pm 17,38
<i>Cu(Valp)</i> ₂ <i>Bipy.H</i> ₂ <i>O</i> (4)	1000	68,01 \pm 23,66
	750	64,90 \pm 27,07
	500	62,17 \pm 22,64
	250	40,14 \pm 31,62
	100	14,65 \pm 12,55
	50	5,59 \pm 6,78
	10	0,79 \pm 1,78
<i>Zn(Valp)</i> ₂ <i>Phen.H</i> ₂ <i>O</i> (5)	1000	88,18 \pm 4,89
	750	82,60 \pm 10,41
	500	69,64 \pm 14,45
	250	59,38 \pm 16,52
	100	57,30 \pm 17,68
	50	50,54 \pm 17,68
	10	17,97 \pm 11,13
<i>Zn(Valp)</i> ₂ <i>Bipy.H</i> ₂ <i>O</i> (6)	1000	85,29 \pm 9,04
	750	71,91 \pm 16,58
	500	61,00 \pm 21,32
	250	24,21 \pm 14,30
	100	0,00 \pm 0,00
Controles		
<i>Na Valp</i>	1000	0,83 \pm 1,86
	750	0,88 \pm 1,96
	500	0,88 \pm 1,96
	250	0,88 \pm 1,96
	100	0,00 \pm 0,00
<i>1,10-Phen</i>	100	97,45 \pm 2,54
	75	88,33 \pm 7,45
	50	54,93 \pm 6,26
	25	32,58 \pm 8,91
	10	15,42 \pm 9,75
<i>2,2-Bipy</i>	100	33,39 \pm 10,54
	75	26,36 \pm 5,67
	50	16,80 \pm 4,88
	25	5,35 \pm 5,75
	10	1,62 \pm 2,30
$K_2Cr_2O_7$ (Ctrl+)	100	29,04 \pm 9,29
	75	12,93 \pm 5,20
	50	8,13 \pm 6,09
	25	3,24 \pm 2,30
	10	2,42 \pm 2,42

Figura 40 - Gráficos de letalidade dos compostos 3, 4, 5 e 6 e dos controles *Na Valp*, *1,10-phen*, *2,2-bipy* e $K_2Cr_2O_7$ frente a *A. salina*.



Os valores de CL_{50} obtidos para os complexos metálicos evidenciam maior toxicidade para os compostos de cobre quando comparados aos análogos de zinco. O

compostos 3 apresentou toxicidade 30 vezes superior ao composto 5, enquanto o composto 4 apresentou toxicidade similar ao análogo de zinco. Em relação aos ligantes neutros, os complexos com o grupo *1,10-Phen* (3 e 5) apresentaram toxicidades maiores que seus análogos com o grupo *2,2-Bipy* (4 e 6). O mesmo padrão pode ser observado ao analisarem-se os controles, onde o composto *1,10-Phen* apresentou toxicidade 3 vezes superior ao composto *2,2-Bipy*. As comparações destes resultados evidenciam a influência direta do da natureza do ligante com a toxicidade do complexo. KELLETT et al., (2012) apresentaram um estudo de citotoxicidade em células comparativo entre complexos de cobre com os ligantes *1,10-Phen* e *2,2-Bipy* e também com os ligantes livres, no qual se observaram resultados muito similares. A justificativa para a maior toxicidade dos complexos com *1,10-Phen* em relação aos análogos com *2,2-Bipy* está no fato da estrutura planar de *1,10-Phen* facilitar a intercalação à α -hélice do DNA e produzir quebras de cadeia. Além disso, o sistema aromático com três anéis conjugados atua como um removedor de elétrons do metal e facilita a ocorrência de reações redox com bases de Lewis, como O_2 molecular. Estas reações produzem ROS, que são igualmente danosos ao DNA. Ressalta-se também que os todos os complexos com *1,10-Phen*, assim como os ligantes livres apresentaram toxicidade superior ao controle positivo $K_2Cr_2O_7$. Isto indica que *A. salina* é mais sensível à intoxicação por compostos aromáticos genotóxicos e mais resistente à intoxicação por compostos oxidantes.

Tabela 13 - Concentrações letais (CL_{50}) para os compostos 3, 4, 5, 6 e os controles frente à *A. salina*.

Composto	CL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Cu(Valp)</i> ₂ <i>Phen</i> (3)	2,60
<i>Cu(Valp)</i> ₂ <i>Bipy.H</i> ₂ <i>O</i> (4)	386,24
<i>Zn(Valp)</i> ₂ <i>Phen.H</i> ₂ <i>O</i> (5)	78,78
<i>Zn(Valp)</i> ₂ <i>Bipy.H</i> ₂ <i>O</i> (6)	409,00
<i>Na Valp</i>	NS
<i>1,10-Phen</i>	46,00
<i>2,2-Bipy</i>	143,11
$K_2Cr_2O_7$ (Ctrl+)	195,99

*NS: Não Significativo

5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE A CULTURAS DE CÉLULAS CHO

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade dos compostos 5 e 6 frente à cultura celular CHO foram obtidos através do ensaio do MTT após um período de exposição de 24 horas. Os dados foram obtidos a partir das médias gerais dos três experimentos (4.6.1). As análises de variância (Anova) para os conjuntos de dados de cada concentração foram realizados pelo programa de Assistência Estatística ASSISTAT[®], versão 7.7. O modo de cálculo utilizado foi o DIC (Experimento Inteiramente Casualizado), com aplicação do teste de Tukey. Os valores de absorção no UV-Vis foram convertidos em % de sobrevivência celular de acordo com a equação abaixo.

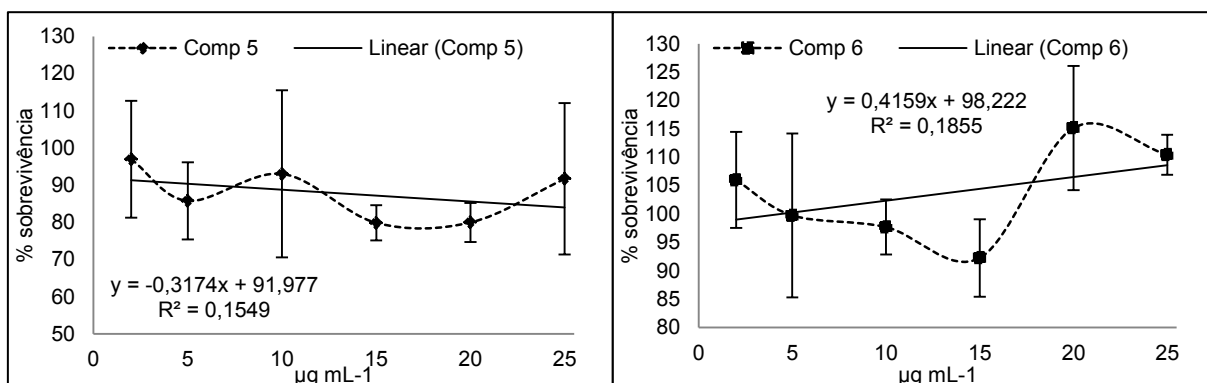
$$\% \text{ sobrevivência média} = \frac{\text{Abs média da concentração}}{\text{Abs média do Ctrl} -} * 100\% \quad (2)$$

Os dados das conversões expressos em % de sobrevivência (Tabela 14) foram plotados em gráficos de dispersão (Figura 41) no programa Microsoft Excel[®].

Tabela 14 - Viabilidade celular da linhagem CHO frente aos compostos 5 e 6.

Composto	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sobrevida (% Média \pm SD)
<i>Zn(Valp)₂Phen.H₂O</i> (5)	25,00	91,70 \pm 20,74
	20,00	80,00 \pm 5,23
	15,00	79,89 \pm 4,75
	10,00	93,05 \pm 22,46
	5,00	85,80 \pm 10,33
	2,00	96,70 \pm 15,72
	0,00 (Ctrl-)	100 \pm 0,0
	<i>Zn(Valp)₂Bipy.H₂O</i> (6)	25,00
20,00		115,17 \pm 10,94
15,00		92,27 \pm 6,81
10,00		97,70 \pm 4,84
5,00		99,76 \pm 14,42
2,00		106,00 \pm 8,45
0,00 (Ctrl-)		100,00 \pm 0,00

Figura 41 - Gráficos de Viabilidade celular dos compostos 5 e 6 testados frente à linhagem celular CHO.



Os gráficos de dispersão valores de CL_{50} obtidos para os complexos metálicos não apresentaram diferenças significativas com relação aos controles negativos. Isto indica não haver citotoxicidade plausível para os intervalos de concentração testados no intervalo de tempo de 24 horas.

6 CONCLUSÃO

Os complexos organometálicos de AVP com Zn^{+2} e Cu^{+2} apresentaram estabilidade química decorrente da natureza ácida dos metais e da natureza básica dos ligantes carboxilatos. O uso de ligantes neutros *1,10-Phen* e *2,2'-Bipy* mostraram-se eficientes na proposta metodológica para a obtenção dos complexos.

As metodologias de síntese para os complexos 1 e 2 apresentaram rendimentos equivalentes às descrições da literatura. As técnicas espectroscópicas de FTIR e FAAS mostraram-se serem suficientes para a determinação das fórmulas moleculares dos compostos 1 e 2 por serem moléculas mais simples. Conclui-se que a metodologia de síntese em água é adequada para a obtenção dos compostos precursores.

As metodologias de síntese para os complexos 3, 4, 5 e 6 apresentaram rendimentos iguais ou superiores aos dados da literatura. O compostos 3 e 4 apresentaram rendimentos similares aos dados da literatura, enquanto o composto 5 apresentou rendimento 85% superior ao citado na literatura. Este resultado deve-se ao fato da metodologia de síntese ter sido reproduzida em um volume de solvente DMF inferior à literatura. Este resultado apresenta uma melhoria da técnica aliada com economia de reagentes e de solvente. O composto 6 apresentou rendimento razoável por tratar-se da primeira síntese relatada para tal composto. A metodologia apresenta parâmetros que podem ser estudados e melhorados para aumentar a viabilidade sintética.

As análises de 1H RMN e ^{13}C RMN mostraram-se poderosas para a identificação estrutural dos complexos de zinco. As estruturas moleculares dos compostos $Zn_2(Valp)_4$ e $Zn(Valp)_2(1,10-Phen).H_2O$ foram confirmadas de modo inequívoco, com dados coerentes aos dados literários. Para o composto inédito com a fórmula molecular idealizada $Zn(Valp)_2(2,2-Bipy).H_2O$, apenas o coeficiente estequiométrico para o grau de hidratação não pode ser confirmado com certeza absoluta. As análises de ESI TOF-MS foram confirmatórias para a identificação apenas para os compostos de zinco II. As abundâncias isotópicas de Zn foram observadas para todos os íons oriundos das fragmentações dos compostos 5 e 6 e garantiram a certeza da presença do metal nas estruturas moleculares. Os complexos de Cu^{+2} não apresentaram bons resultados na análise de ESI TOF-MS em consequência da instabilidade no ox do metal. Contudo, os resultados das análises de PF, FTIR, UV-Vis e FAAS corroboram com os dados literários e podem ser considerados verdadeiros.

Quanto aos experimentos de atividade de ROS, todos os compostos não

apresentaram atividade de *Sod-like* para a metodologia proposta. Tal comportamento químico pode decorrer da total ocupação dos orbitais *d* do metal pelos elétrons dos ligantes de modo a que desfavorece a atividade catalítica do centro metálico. Pode-se concluir que os complexos mantêm-se estáveis no meio reacional sem produzir dissociação dos ligantes. Contudo, todos os compostos apresentaram atividade para *Cat-like*. Os resultados positivos para mimetização da catalase indicam a presença de outro mecanismo de atividade redox dos complexos, possivelmente pelo mecanismo análogo à reação de Fenton.

A metodologia executada no ensaio TAS mostrou-se adequada, pois há concordância nas razões dose-resposta para todos os compostos testados. A robustez e a praticidade do método o qualificam para uso como modelo de citotoxicidade aguda para outros compostos organometálicos. O ensaio de citotoxicidade frente à *A. salina* mostrou que o composto inédito $Zn(Valp)_2(2,2\text{-Bipy})H_2O$ (6) possui a menor citotoxicidade aguda entre todos os compostos testados. O ensaio também indicou que os complexos com 1,10-Phen são mais tóxicos que seus análogos com 2,2'-Bipy, o que pressupõe o uso do ligante 2,2'-Bipy como ligante secundário do metal possa ser mais tolerada por sistemas biológicos.

O ensaio de citotoxicidade com células CHO para os compostos de zinco não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles negativos após 24 horas de exposição. Estes parâmetros corroboram com os resultados obtidos no experimento TAS.

7 **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados indicaram que os complexos de 5 e 6 possuem citotoxicidade, portanto deverão ser submetidos a ensaios de genotoxicidade em modelos celulares.

A atividade antiepiléptica e o perfil metabólico dos compostos 5 e 6 deverão ser avaliados em modelos animais, como ratos Wistar e Zebra-fish.

A definição inequívoca da estrutura tridimensional do composto 6 deverá ser obtida por Difração de Raios-X e os dados deverão ser publicados na forma de um artigo em um periódico da área da cristalografia.

A produção de novos compostos análogos com outros ligantes nitrogenados, como purinas e xantinas deverá ser realizada e os compostos deverão ser testados pelos mesmos modelos.

Do ponto de vista acadêmico, o trabalho pesquisa proporcionou a abertura de uma nova linha de pesquisa com grande potencial a ser explorado por novos estudantes. Ressalta-se que a pesquisa com complexos demandam ensaios que são realizados através de parcerias com outras instituições de ensino e pesquisa. O tema deverá ser continuado em um projeto de doutorado.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT. **DEPAKOTE® ER (Divalproex Sodium tablets):HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION**. 2009.
- ABU, H.; DARAWSHEH, M. D.; RAPPOCCIOLO, E. Synthesis , crystal structure , spectroscopic and biological properties of mixed ligand complexes of zinc (II) valproate with 1 , 10-phenanthroline and 2-aminomethylpyridine. **Polyhedron**, v. 61, p. 235–241, 2013. Elsevier Ltd.
- ABUHIJLEH, A. . L.; WOODS, C. Characterization and catecholase-mimetic adducts of copper (II) valproate . Crystal adduct behavior of imidazole structure of the. **Inorganica Chimica Acta**, v. 209, p. 187–193, 1993.
- ABUHIJLEH, A. L. Ternary Copper (II) Complexes of the Anticonvulsant Drug Valproate with Diimines as Superoxide Dismutase Mimics. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 0134, n. ii, 1997.
- ABUHIJLEH, A. L.; ALI, H. A.; EMWAS, A. Synthesis, spectral and structural characterization of dinuclear rhodium (II) complexes of the anticonvulsant drug valproate with theophylline and caffeine. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 694, n. 22, p. 3590–3596, 2009. Elsevier B.V.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUES, J. Mecanismo e Aplicações da Reação de Fenton Assistida por Compostos Fenólicos Redutores de Ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623–628, 2007.
- ALIAGA, M. E.; ANDRADE-ACUÑA, D.; LÓPEZ-ALARCÓN, C.; SANDOVAL-ACUÑA, C.; SPEISKY, H. Cu(II)–disulfide complexes display simultaneous superoxide dismutase- and catalase-like activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 129, p. 119–126, 2013. Elsevier B.V.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Histórico do desenvolvimento da tecnologia de cultura de tecidos. **Cultivo celular**. p.215–253, 2007.
- AMARANTE, C. B. DO; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431–434, 2011.
- ANDRADE, M. **Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultrastruturais de microcistinas em células Vero**, 2007. Universidade do Porto.
- ASHE, D.; ALLEYNE, T.; WILSON, M.; SVISTUNENKO, D.; NICHOLLS, P. Redox equilibration after one-electron reduction of cytochrome c oxidase: Radical formation and a

possible hydrogen relay mechanism. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 554, p. 36–43, 2014. Elsevier Inc.

ATKINS, P. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5th ed. Bookman, 2012.

AYALA, J. D. Química de coordenação: sais duplos e compostos de coordenação. ,2014. Disponível em: <<http://qui.ufmg.br/~ayala/matdidatico/coord.pdf>>. .

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for Superoxide Dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, 1987.

BARBOSA, A. C. **Quelato Complexos de Oxovanádio (IV): Potenciais Mimetizadores da Insulina**, 2004. UFSCAR.

BELLO-RAMÍREZ, A. M.; CARREÓN-GARABITO, B. Y.; NAVA-OCAMPO, A. A. Do structural properties explain the anticonvulsant activity of valproate metabolites? A QSAR analysis. **Epilepsia**, v. 43, n. 5, p. 475–81, 2002.

BLENCOWE, D. K.; MORBY, A. P. Zn (II) metabolism in prokaryotes. **FEMS MICROBIOLOGY Reviews**, v. 27, p. 291–311, 2003.

BONCLER, M.; RÓŻALSKI, M.; KRAJEWSKA, U.; PODSĘDEK, A.; WATALA, C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 69, n. 1, p. 9–16, 2014.

BORGES, B. E.; TEIXEIRA, V. R.; APPEL, M. H.; et al. De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. **Chemico-biological interactions**, v. 206, n. 1, p. 37–46, 2013. Elsevier Ireland Ltd.

BROADHURST, C. L.; SCBMIDT, W. F.; REEVES, J. B.; et al. Characterization and Structure by NMR and FTIR Spectroscopy , and Molecular Modeling of Chromium (III) Picolinate and Nicotinate Complexes Utilized for Nutritional Supplementation. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 119–130, 1997.

BROWNE, R. A. Acute response versus reproductive performance in five strains of brine shrimp exposed to copper sulphate. **Marine Environmental Research**, v. 3, n. 1980, p. 185–193, 1979.

BRUKER DALTONICS INC. **micrOTOF-Q II**. 2012.

CAO, R.; FRAGOSO, A.; SANCHEZ, I.; DIAZ, A. Interpretation of the sod-like activity of a series of copper (II) complexes with thiosemicarbazones. , v. 2, p. 358–360, 1999.

CARLTON, D. D.; SCHUG, K. A. A review on the interrogation of peptide-metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 686, n. 1-2, p. 19–39, 2011. Elsevier B.V.

COATES, C. J.; NAIRN, J. Diverse immune functions of hemocyanins. **Developmental and comparative immunology**, v. 45, n. 1, p. 43–55, 2014. Elsevier Ltd.

COATES, C. J.; WHALLEY, T.; NAIRN, J. Phagocytic activity of *Limulus polyphemus* amebocytes in vitro. **Journal of invertebrate pathology**, v. 111, n. 3, p. 205–10, 2012. Elsevier Inc.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271–7, 1986.

DÍAZ, A.; LOEWEN, P. C.; FITA, I.; CARPENA, X. Thirty years of heme catalases structural biology. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 102–10, 2012. Elsevier Inc.

DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas** Uso da técnica de espectrometria de massas com ioniza, 2011. Universidade Federal de Minas Gerais.

DUBIEL, S. M.; CIEŚLAK, J.; ALENKINA, I. V.; OSHTRAKH, M. I.; SEMIONKIN, V. A. Evaluation of the Debye temperature for iron cores in human liver ferritin and its pharmaceutical analogue, Ferrum Lek, using Mössbauer spectroscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 89–93, 2014.

FARKAS, D.; HANSSON, Ö. Thioredoxin-mediated reduction of the photosystem I subunit PsaF and activation through oxidation by the interaction partner plastocyanin. **FEBS Letters**, v. 585, n. 12, p. 1753–1758, 2011. Federation of European Biochemical Societies.

FROUDARAKIS, M. E.; GREILLIER, L.; MONJANEL-MOUTERDE, S.; et al. Intrapleural administration of lipoplatin in an animal model. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 72, n. 1, p. 78–83, 2011. Elsevier Ireland Ltd.

GIANNINI, G.; MARZI, M.; PEZZI, R.; et al. N-Hydroxy-(4-oxime)-cinnamide: a versatile scaffold for the synthesis of novel histone deacetylase [correction of deacetylase] (HDAC) inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 8, p. 2346–9, 2009. Elsevier Ltd.

GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11th ed. 2012.

GOFFLOT, F.; NASSOGNE, M. C.; ETZION, T.; et al. In vitro neuroteratogenicity of valproic acid and 4-en-VPA. **Neurotoxicology and teratology**, v. 17, n. 4, p. 425–35, 1995.

GOSWAMI, T. K.; GADADHAR, S.; GOLE, B.; KARANDE, A. A.; CHAKRAVARTY, A. R. Photocytotoxicity of copper(II) complexes of curcumin and N-ferrocenylmethyl-L-amino

acids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 800–10, 2013. Elsevier Masson SAS.

GRIF, D. M.; DUFF, B.; SUPONITSKY, K. Y.; et al. Novel trans -platinum complexes of the histone deacetylase inhibitor valproic acid ; synthesis , in vitro cytotoxicity and mutagenicity. , v. 105, p. 793–799, 2011.

HADJIKOSTAS, C. C.; KATSOULOS, C. A.; SIGALAS, M. P.; TSIPIS, C. A. Spectral and Magnetic Characterization of Amine Adducts of Copper (II) Valproate. , v. 167, p. 165–169, 1990.

HIJAZI, A. A.; DARAWSHEH, M. D.; RAPPOCCIOLO, E. Synthesis, crystal structure, spectroscopic and biological properties of mixed ligand complexes of zinc(II) valproate with 1,10-phenanthroline and 2-aminomethylpyridine. **Polyhedron**, v. 61, p. 235–241, 2013. Elsevier Ltd.

HUREAU, C.; FALLER, P. Abeta-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1212–7, 2009. Elsevier Masson SAS.

IDA-ETO, M.; OYABU, A.; OHKAWARA, T.; et al. Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and dopaminergic systems in the rat brain: implications for association with developmental disorders. **Brain & development**, v. 35, n. 3, p. 261–4, 2013.

INTERCHIM INC. Water Soluble Tetrazolium Salts (WSTs). ,2013. Montiuçon Cedex, France: Interchim. Disponível em: <<http://www.interchim.fr/ft/F/F98881.pdf>>. .

JASIEWICZ, B.; BOCZOŃ, W. A comparative study of sparteine, α -isosparteine and 2-methylsparteine monoperchlorate salts and zinc (II) complexes by NMR chemical shifts. **Journal of Molecular Structure**, v. 752, n. 1-3, p. 115–123, 2005.

JAUREGUI, J. I.; CASTILLA, A.; MORTE, S.; et al. An aspartyl-carboxipeptidase is involved in the processing of pre-C sequence and C gene products and HBeAg secretion in human cells. **Journal of Hepatology**, v. 7, n. 1, p. 43, 1988.

JAYASEKARA, S.; DROWN, D. B.; SHARMA, R. P. Tolerance to cadmium and cadmium-binding ligands in Great Salt Lake brine shrimp (*Artemia salina*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 11, n. 1, p. 23–30, 1986.

JENKINS, J. E.; SEITZ, M. E.; BUITRAGO, C. F.; et al. The impact of zinc neutralization on the structure and dynamics of precise polyethylene acrylic acid ionomers: A solid-state ^{13}C NMR study. **Polymer**, v. 53, n. 18, p. 3917–3927, 2012. Elsevier Ltd.

KALUĐEROVIĆ, G. N.; GÓMEZ-RUIZ, S.; MAKSIMOVIĆ-IVANIĆ, D.; PASCHKE, R.; MIJATOVIĆ, S. Metals in medicine. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2012, p. 705907, 2012.

KAR, P.; DREW, M. G. B.; GHOSH, A. Synthesis, structure and catalase activity of three new manganese(III) complexes with a N,N,O donor Schiff-base ligand. **Inorganica Chimica Acta**, v. 405, p. 349–355, 2013. Elsevier B.V.

KEITH-ROACH, M. J. A review of recent trends in electrospray ionisation-mass spectrometry for the analysis of metal-organic ligand complexes. **Analytica chimica acta**, v. 678, n. 2, p. 140–8, 2010. Elsevier B.V.

KELLETT, A.; HOWE, O.; O'CONNOR, M.; et al. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n. 3, p. 564–76, 2012.

KLANICOVÁ, A.; HOUCK, J. D.; BARAN, P.; TRÁVNÍČEK, Z. Synthesis, X-ray structures, properties and SOD-like activity of ternary copper(II) complexes showing the N4O2 coordination with a combination of monodentate and bidentate N-donor ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 384, n. 3, p. 47–53, 2012.

KOSHIKARI, Y.; SAKAKURA, A.; ISHIHARA, K. N,N-Diarylammonium pyrosulfate as a highly effective reverse micelle-type catalyst for hydrolysis of esters. (Supporting Information). **Organic letters**, v. 14, n. 12, p. 3194–7, 2012.

KRIPLI, B.; BARÁTH, G.; BALOGH-HERGOVICH, É.; et al. Correlation between the SOD-like activity of hexacoordinate iron(II) complexes and their Fe³⁺/Fe²⁺ redox potentials. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 14, n. 1, p. 205–209, 2011. Elsevier B.V.

KROCZEWSKA, D.; KURZAK, B.; MATCZAK-JON, E. Mixed-ligand zinc (II) complexes with diethylenetriamine (or triethylenetetramine) and a - (or b -) alaninehydroxamic acids in water solution . Potentiometric and NMR studies. **Polyhedron**, v. 21, p. 2183–2193, 2002.

LI, W.-X.; ZHENG, Y.-S.; CHAI, W.-J.; et al. Fluorescence emission mechanism and fluorescence properties of ternary Tb(III) complex with diphenyl sulphoxide and bipyridine. **Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence**, v. 26, n. 6, p. 754–61, 2011.

LIDE, D. R. **TeamLRN CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 85th ed. 2003.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.

LINNELL, H.; KACZMARCZYK, A. Ultraviolet spectra of Diimines compounds. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 1196–1200, 1961.

LOGARTO PARRA, A.; SILVA YHEBRA, R.; GUERRA SARDIÑAS, I.; IGLESIAS BUELA, L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.

LORUSSO, D.; PETRELLI, F.; COINU, A.; RASPAGLIESI, F.; BARNI, S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 133, n. 1, p. 117–23, 2014. Elsevier Inc.

MARTINDALE. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 36th ed. Chicago, London, 2009.

MARTINS, D.; ENGLISH, A. M. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. **Redox biology**, v. 2, p. 308–13, 2014. Elsevier.

MATSUMOTO, Y.; JASANOFF, A. Metalloprotein-based MRI probes. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1021–9, 2013. Federation of European Biochemical Societies.

MENÉNDEZ, A. M.; MONTEMERLO, J. H.; GUSTAVO, N.; et al. Relationship between copper doses in parenteral nutrition mixtures, serum copper, erythrocyte copper levels, ceruloplasmin and C-reactive protein, in critically ill patients. **e-SPEN Journal**, v. 9, n. 1, p. e20–e25, 2014. Elsevier Ltd.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31–34, 1982.

MINAMISONO, T.; TAKIYAMA, H. Control of polymorphism in the anti-solvent crystallization with a particular temperature profile. **Journal of Crystal Growth**, v. 362, p. 135–139, 2013. Elsevier.

MONNERET, C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. **Annales pharmaceutiques françaises**, v. 69, n. 6, p. 286–95, 2011. Elsevier Masson SAS.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. DO. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY” APLICADA AO ESTUDO DE ESPÉCIES INORGÂNICAS E ORGANOMETÁLICAS. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556–563, 2003.

MORRIS, J. E. HYDRATION , ITS REVERSIBILITY , AND THE BEGINNING OF DEVELOPMENT IN THE BRINE SHRIMP , ARTEMIA SALINA. **Comp. Biochem. Physiology**, v. 39, p. 843 – 857, 1971.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MUJTABA, B.; ADENAIKE, M.; YAGANTI, V.; MUJTABA, N.; JAIN, D. Anaphylactic reaction to Tc-99m sestamibi (Cardiolite) during pharmacologic myocardial perfusion imaging. **Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology**, v. 14, n. 2, p. 256–8, 2007.

MÜLLER, U. **INORGANIC STRUCTURAL CHEMISTRY**. 2, 2006.

MURRAY, P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1626–30, 2010.

NAKAGAWA, M.; NAGAI, K.; MINAMI, I.; et al. Copper-deficiency anemia after esophagectomy: A pitfall of postoperative enteral nutrition through jejunostomy. **International journal of surgery case reports**, v. 5, n. 6, p. 311–4, 2014. Surgical Associates Ltd.

NURGE, M. E.; ANDERSON, C. R.; BATES, E. Metabolic and Nutritional Implications of valproic acid. **Nutrition Research**, v. 11, n. c, p. 949–960, 1991.

OUARI, K.; BENDIA, S.; WEISS, J.; BAILLY, C. Spectroscopic, Crystal Structural and Electrochemical Studies of Zinc(Ii)-Schiff Base Complex Obtained from 2,3-Diaminobenzene and 2-Hydroxy Naphthaldehyde. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, , n. Ii, 2014. Elsevier B.V.

PAP, J. S.; KRIPLI, B.; VÁRADI, T.; et al. Comparison of the SOD-like activity of hexacoordinate Mn(II), Fe(II) and Ni(II) complexes having isoindoline-based ligands. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 911–8, 2011. Elsevier Inc.

PASSARELLI, M. K.; WINOGRAD, N. Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1811, n. 11, p. 976–90, 2011. Elsevier B.V.

PATIL, M.; SHETH, K. A.; KRISHNAMURTHY, A. C.; DEVARBHAVI, H. A Review and Current Perspective on Wilson Disease. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 3, n. 4, p. 321–336, 2013. Elsevier Ltd.

PELLERITO, O.; PRINZIVALLI, C.; FORESTI, E.; et al. Synthesis, chemical characterization and biological activity of new histone acetylation/deacetylation specific inhibitors: a novel and potential approach to cancer therapy. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 125, p. 16–25, 2013. Elsevier Inc.

PIRES, B. M.; SILVA, D. M.; VISENTIN, L. C.; et al. Synthesis, characterization and catalase-like activity of the tetranuclear iron(III) complex involving a (μ -oxo)(μ -hydroxo)bis(μ -alkoxo)tetra(μ -carboxylato)tetrairon core. **Inorganica Chimica Acta**, v. 407, p. 69–81, 2013. Elsevier B.V.

RICCO, R.; POTOCKI, S.; KOZLOWSKI, H.; VALENSIN, D. NMR investigations of metal interactions with unstructured soluble protein domains. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 269, p. 1–12, 2014. Elsevier B.V.

SANDALIO, L.; RÍO, L. DEL; PALMA, J.; BUENO, P.; CORPAS, F. RANCISCO. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. **Free radical biology & medicine**, v. 13, n. 5, p. 557–80, 1992.

SANTOS, A.; DUARTE, A. G.; FEDOROV, A.; MARTINHO, J. M. G.; MOURA, I. Rubredoxin mutant A51C unfolding dynamics: a Förster Resonance Energy Transfer study. **Biophysical chemistry**, v. 148, n. 1-3, p. 131–7, 2010. Elsevier B.V.

SARGAZI, M.; SHENKIN, A.; ROBERTS, N. B. Zinc induced damage to kidney proximal tubular cells: studies on chemical speciation leading to a mechanism of damage. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 27, n. 3, p. 242–8, 2013. Elsevier GmbH.

SHRIVER, D. **Química Inorgânica**. 4th ed. Bookman, 2008.

SILVERSTEIN, R. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6th ed. New York, 1998.

SINKO, P. **Martin; Físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5th ed. Artmed, 2008.

SKOOG, D. **Principios de Análisis Instrumental**. 5th ed. Madrid, 2000.

SOKOLOVSKA, J.; ISAJEV, S.; BAUMANE, L.; et al. P5 Enhanced expression of xanthine oxidase and NO synthases causing the overproduction of NO in kidneys of diabetic animals can be reduced by 1,4-dihydropyridines. **Nitric Oxide**. v. 31, p.S15, 2013. Elsevier Inc.

SPINCEMAILLE, P.; CHANDHOK, G.; NEWCOMB, B.; et al. The plant decapeptide OSIP108 prevents copper-induced apoptosis in yeast and human cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1843, n. 6, p. 1207–15, 2014. Elsevier B.V.

SQUITTI, R.; SIOTTO, M.; POLIMANTI, R. Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 35S2, p. S40–S50, 2014. Elsevier Ltd.

STILLEBROER, A. B.; MULDER, P. F. A.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; OOSTERWIJK, E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. **European urology**, v. 58, n. 1, p. 75–83, 2010. European Association of Urology.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1st ed. 2004.

SZIGYÁRTÓ, I. C.; SZABÓ, L.; SIMÁNDI, L. I. Kinetic studies on the manganese(II) complex catalyzed oxidation of epinephrine. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 372, p. 66–71, 2013. Elsevier B.V.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 100, n. 12, p. 1925–35, 2006.

UCHIDA, R.; ISHIKAWA, S.; TOMODA, H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 2, p. 141–145, 2014. Elsevier.

VASSILIEV, V.; HARRIS, Z. L.; ZATTA, P. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. **Brain research. Brain research reviews**, v. 49, n. 3, p. 633–40, 2005.

VEENSTRA, T. D. Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions. **Biophysical chemistry**, v. 79, n. 2, p. 63–79, 1999.

VEITÍA, S. A.; DUMAS, F.; MORGANT, G. US Patent n° 2012/0142658A1. ,2012. USA.

VEITÍA, S.-I. M.; DUMAS, F.; MORGANT, G.; et al. Synthesis, structural analysis and anticonvulsant activity of a ternary Cu(II) mononuclear complex containing 1,10-phenanthroline and the leading antiepileptic drug valproic acid. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1286–93, 2009.

VIETH, J. T.; LANE, D. R. Anemia. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 613–628, 2014.

WADA, A.; JITSUKAWA, K.; MASUDA, H. Superoxide disproportionation driven by zinc complexes with various steric and electrostatic properties. **Angewandte Chemie (Enzyme Models)**, v. 52, n. 47, p. 12293–7, 2013.

WANG, Q.; JAHAN, M. S.; LIU, S.; MIAO, Q.; NI, Y. Lignin removal enhancement from prehydrolysis liquor of kraft-based dissolving pulp production by laccase-induced polymerization. **Bioresource technology**, v. 164, p. 380–5, 2014. Elsevier Ltd.

WEED, R. I.; REED, C. F.; BERG, G. IS HEMOGLOBIN AN ESSENTIAL STRUCTURAL COMPONENT OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES ?* This investigation of human red cell membranes was undertaken in order to determine whether the presence of hemoglobin in the membrane is essential for maintenance of the. **Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 4, p. 581–588, 1963.

WEISS, K. H.; THURIK, F.; GOTTHARDT, D. N.; et al. Efficacy and safety of oral chelators in treatment of patients with Wilson disease. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 11, n. 8, p. 1028–35.e1–2, 2013. Elsevier Inc.

WICKRAMASINGHE, S. N. Morphology, biology and biochemistry of cobalamin- and folate-deficient bone marrow cells. **Baillière's clinical haematology**, v. 8, n. 3, p. 441–459, 1995.

WINTERER, G. Valproate and GABAergic system effects. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 11, p. 2050–1, 2003.

WOODWARD, R. B. THE TOTAL SYNTHESIS OF CHLOROPHYLL *. **Tetrahedron**, v. 46, n. 22, p. 383–404, 1960.

YAMAUCHI, Y.; IZUMI, Y.; ASAKURA, K.; et al. Lovastatin and valproic acid additively attenuate cell invasion in ACC-MESO-1 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 410, n. 2, p. 328–32, 2011. Elsevier Inc.

ZHANG, B.; LASH, T. D. Total synthesis of the porphyrin mineral abelsonite and related petroporphyrins with five-membered exocyclic rings. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 39, p. 7253–7256, 2003.

ZHANG, H.-M.; CAO, J.; TANG, B.-P.; WANG, Y.-Q. Effect of TiO₂ nanoparticles on the structure and activity of catalase. **Chemico-biological interactions**, v. 219C, p. 168–174, 2014. Elsevier Ireland Ltd.

ZHOU, X.; YANG, L.; YAN, G.; et al. Dopamine-containing gadolinium complex as magnetic resonance imaging contrast agent. **Journal of Rare Earths**, v. 30, n. 9, p. 884–889, 2012. The Chinese Society of Rare Earths.

ZOLAL, A.; SAMEŠ, M.; BURIAN, M.; et al. The effect of a gadolinium-based contrast agent on diffusion tensor imaging. **European journal of radiology**, v. 81, n. 8, p. 1877–82, 2012.