

RELATÓRIO ANUAL

COMPLEXOS DE PLATINA(II) DA PIRAZINAMIDA: POTENCIAIS
AGENTES ANTIMICROBIANOS E ANTINEOPLÁSICOS

Aluno: Lucas Sartori
Orientador: Nicolás A. Rey

Índice

- 1- Introdução
- 2- Objetivos
- 3- Parte Experimental
 - 3.1- Sínteses
 - 3.1.1- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl₂(PZA)₂]·1½H₂O (1)
 - 3.1.2- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl₂(DMSO)(PZA)] (2)
 - 3.2- Caracterizações e Análises
 - 3.2.1- Análise Elementar (CHN)
 - 3.2.2- Análise Termogravimétrica (TG/DTG)
 - 3.2.3- Espectroscopia na Região de Infravermelho (IV)
 - 3.2.4- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
 - 3.2.5- Estudos de Modelagem Computacional
 - 3.2.6- Ensaio de Atividade Citotóxica
- 4- Resultados e Discussão
 - 4.1- Análise Elementar (CHN)
 - 4.2- Análise Termogravimétrica (TG/DTG)
 - 4.3- Espectroscopia na Região de Infravermelho (IV)
 - 4.4- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
 - 4.5- Estudos de Modelagem Computacional
 - 4.6- Ensaio de Atividade Citotóxica
- 5- Conclusões
- 6- Bibliografia
- 7- ANEXO – Comunicação dos resultados

1- Introdução

O estudo de complexos metálicos para uso na quimioterapia teve grande impulso depois da descoberta das propriedades antitumorais do complexo de coordenação *cis*-diaminodicloroplatina(II) (Figura 1) pelo físico americano Barnett Rosenberg em 1960. Mais comumente conhecida como cisplatina, ela é um dos compostos mais utilizados até hoje nos tratamentos de câncer de pulmão, cabeça, esôfago, estômago, testículo, etc. [1].

A atividade citotóxica da cisplatina está relacionada com a formação de adutos com as bases nitrogenadas do DNA, o que leva a uma deformação na estrutura normal dessa molécula, sugerindo a morte das células tumorais ao bloquear os processos de replicação e transcrição do DNA, impedindo a síntese de novas células cancerígenas.

Por outro lado, como em qualquer agente quimioterápico, o uso sistemático da cisplatina gera diversos efeitos colaterais como vômitos e náuseas causadas pelos efeitos neurotóxicos e nefrotóxicos gerados pelo acúmulo desse composto no organismo. Além disso, o surgimento de linhagens cancerígenas resistentes à atuação da cisplatina também acaba sendo um problema e a busca por novos medicamentos mais eficazes e menos tóxicos torna-se necessária, surgindo assim um novo campo de interesse na área de pesquisa da quimioterapia. Um exemplo é a carboplatina (Figura 1), droga da segunda geração de compostos de platina que, apesar de apresentar atividade antitumoral menor que a da cisplatina, mostra menor toxicidade em função da presença do grupamento orgânico em sua estrutura.

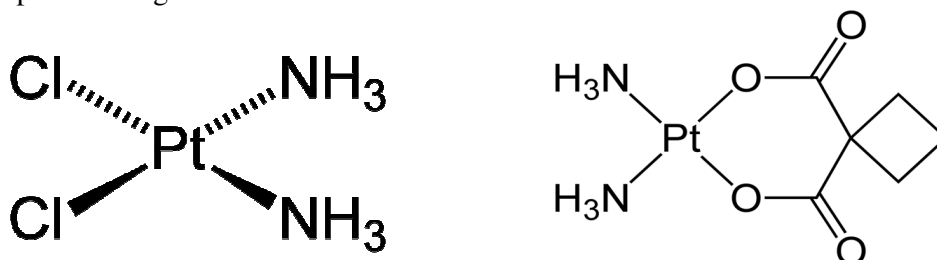


Figura 1. Fórmula estrutural da cisplatina (esquerda) e da carboplatina (direita).

A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina foi realmente um grande marco na história da Química Medicinal. Esse fato abriu os olhos da comunidade científica, que tomou consciência das inúmeras possibilidades para a exploração das propriedades terapêuticas dos complexos metálicos, o que levou ao desenvolvimento de inúmeras pesquisas que visam estudar os mecanismos de ação de tais compostos assim como o desenvolvimento de novos fármacos que possuam características semelhantes, mas que possam oferecer soluções para os presentes problemas de resistência tumoral e efeitos colaterais diversos.

Estudos mostram que, em geral, observa-se que todos os complexos de platina com um determinado tamanho e forma, com certa polaridade e capazes de se ligar a biomoléculas (seja de forma fraca, moderada ou forte) provavelmente terão atividade anticancerígena [2].

A tuberculose é uma doença grave causada pelo microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo responsável pela morte de cerca de um bilhão de pessoas nos últimos dois séculos [3]. Ela continua sendo um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, voltando a ocupar papel de destaque entre as principais doenças infectocontagiosas. Estima-se que a bactéria causadora, também conhecida como bacilo de Koch, tenha evoluído há 15.000 ou 20.000 anos a partir de outras bactérias do gênero *Mycobacterium* [4].

Transmitida basicamente pelo ar, a tuberculose pode atingir todos os órgãos do corpo; porém, como o bacilo de Koch se reproduz e se desenvolve rapidamente em tecidos mais oxigenados, o pulmão é o principal órgão atingido pela doença [5]. O espirro ou tosse de uma pessoa infectada libera para o ar cerca de dois milhões de bacilos, os quais permanecem em suspensão durante horas. Atualmente, a tuberculose mata no mundo aproximadamente 3,0 milhões de pessoas por ano, incluindo mais adultos que a AIDS, a malária e as doenças tropicais combinadas.

A disseminação da AIDS pelo mundo acaba piorando ainda mais a situação, pois a pessoa infectada com o vírus HIV acaba tendo seu sistema imunológico enfraquecido, deixando-o mais susceptível à infecção.

A tuberculose é uma doença contagiosa grave, classificada no grupo das doenças ditas negligenciadas, pois grande parte de suas vítimas se encontram em países pobres e em desenvolvimento (Figura 2). Devido ao baixo investimento no combate à doença, os fármacos atualmente utilizados apresentam problemas diversos, como o grande número de efeitos colaterais e a longa duração do tratamento (de seis a doze meses). Outro grande desafio está relacionado com o surgimento de uma resistência cruzada aos fármacos existentes no mercado, consequência de poucos e antigos medicamentos disponíveis e dos insucessos na cura da doença, seja por abandono do tratamento ou por erros na administração das drogas [6]. Devido a estes e outros problemas como infecções oportunistas causadas por bactérias ou vírus, é necessário buscar novos fármacos mais eficazes, capazes de serem administrados por períodos de tempo mais curtos e com menos efeitos colaterais.

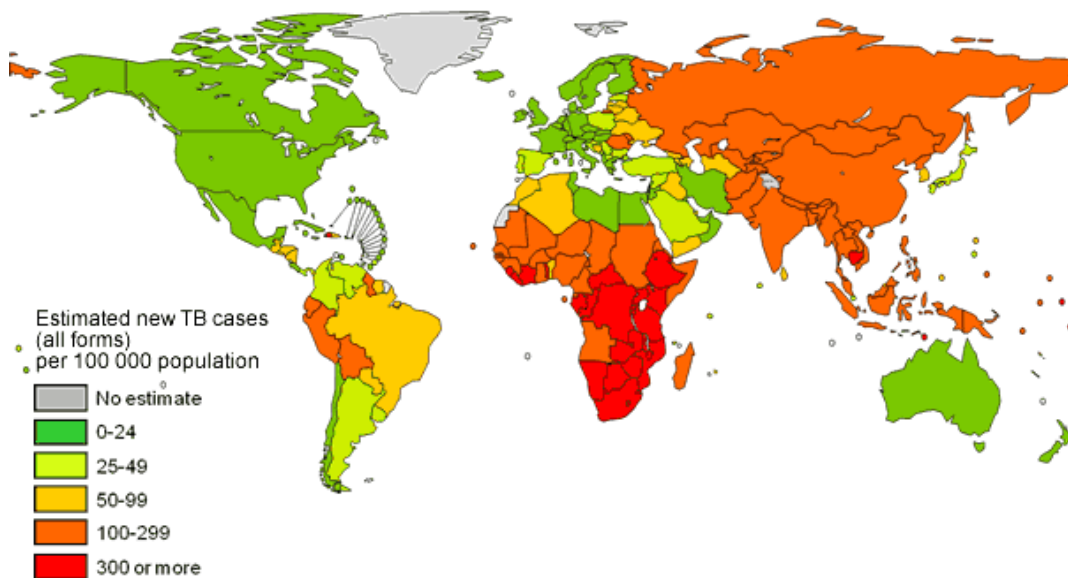


Figura 2. Distribuição estimada dos casos de tuberculose no mundo em 2006. (Fonte: OMS)

A recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento da tuberculose é à base de rifampicina em associação com outros fármacos, principalmente isoniazida, pirazinamida e etambutol, chamados de tuberculostáticos de primeira escolha. A justificativa para utilização de múltiplos fármacos é que o *Mycobacterium* se torna resistente espontaneamente, mas apresenta diferentes tempos de mutação para cada fármaco. Os fármacos de primeira escolha, isoniazida, pirazinamida, rifampicina e etambutol são os principais, e combinam o máximo de eficácia com um grau aceitável de toxicidade. A combinação entre isoniazida e rifampicina cura de 95-98% dos casos, e

no caso da adição da pirazinamida à combinação destes dois compostos, por um período de dois meses, permite-se reduzir o tempo de tratamento de nove para seis meses [7].

A pirazinamida (PZA, $C_5H_5ON_3$, Figura 3), sintetizada originalmente em 1936, porém somente introduzida na clínica a partir de 1970 [8], como pode-se perceber, é bastante importante no tratamento da tuberculose, principalmente nos primeiros meses de tratamento. Por apresentar em sua estrutura diferentes possíveis sítios de coordenação (nitrogênios aromáticos, oxigênio de amida), ela torna-se especialmente atraente quando trata-se da química de coordenação, pois pode-se ligar de diferentes maneiras aos íons metálicos.

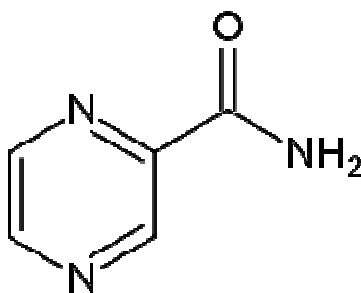


Figura 3. Fórmula estrutural do antituberculostático pirazinamida.

Na busca por medicamentos mais eficazes para possíveis tratamentos de doenças como o câncer e a tuberculose, o presente projeto visa à síntese de novos complexos de coordenação de platina(II) da pirazinamida, tendo em mente que a união dos potenciais biológicos de ambos parece ser uma estratégia de ação bastante promissora.

2- Objetivos

Síntese e caracterização de novos compostos de platina(II) de PZA. Avaliação do potencial antimicrobiano e antitumoral dos mesmos. Identificação de possíveis espécies ativas.

3- Parte Experimental

3.1- Síntese

3.1.1- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl₂(PZA)₂] \cdot 1½H₂O (1)

Dissolveu-se 0,50 mmol de PZA em aproximadamente 3 mL de água deionizada, mantendo-o sobre agitação à temperatura ambiente. Em seguida, preparou-se uma solução com 0,25 mmol de tetracloroplatinato(II) e 2 mL de água deionizada. A solução do tetracloroplatinato (II) foi adicionada gota a gota sobre a outra durante o período aproximado de 20 minutos. A mistura permaneceu sobre agitação durante 24h, e o precipitado amarelo (Figura 4) formado foi separado por filtração a vácuo, lavado com pequenas porções de água e éter e etílico e secado no vácuo.

O complexo (1), inédito, foi caracterizado por análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio, termogravimetria, espectroscopia na região de infravermelho e RMN de ¹H (em solução) e de ¹³C (estado sólido). Foram realizados testes citotóxicos em linhagem de células tumorais humanas e estudos de modelagem computacional.



Figura 4. Síntese do composto inédito cis -[PtCl₂(PZA)₂] \cdot 1½H₂O em balão reacional.

3.1.2- Síntese do Complexo cis -[PtCl₂(DMSO)(PZA)] (2)

Este segundo composto inédito, de coloração amarela mais intensa, foi formado depois de, em solução de DMSO, uma molécula de pirazinamida ser substituída por uma molécula do solvente. O precipitado formado nessa solução foi filtrado a vácuo, lavado com pequenas alíquotas de água e secado no vácuo.

A caracterização desse complexo, até a preparação desse relatório, foi efetuada através de análise elementar (CHN) e espectroscopia na região do infravermelho (IV). A caracterização completa deste composto encontra-se em andamento.

3.2- Caracterizações e Análises

3.2.1- Análise Elementar (CHN)

A quantificação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada em um Analisador Elementar (CHNS-O), modelo EA 1110, da CE Instruments. As amostras foram pesadas (2–2,5 mg) em balança analítica com precisão de $1,0 \times 10^{-4}$ g em cápsulas de estanho. Os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foram analisados simultaneamente, mediante curva de calibração obtida com padrões secos e de alta pureza, com tempo de queima de 600 segundos, sob temperatura de 1000 °C e fluxo de gás hélio. As análises foram realizadas em duplicata.

3.2.2- Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

Para as análises termogravimétricas, o complexo (1) foi pesado em cadinho de platina, em balança Termogravimétrica Perkin – Elmer TGA 7, e analisado em equipamento da TA Instruments, um SDT – 2960. A análise foi feita com fluxo de 100 mL/min de nitrogênio, com um aumento na temperatura de 5 °C por min e faixa de aquecimento de 20 a 900 °C. A análise termogravimétrica gera como resultado uma curva de decomposição térmica que fornece os percentuais dos fragmentos de massa perdidos em função da temperatura. As informações obtidas são importantes, pois identificando os grupos referentes a esses fragmentos de massa, pode-se obter informações sobre a estrutura do complexo formado.

3.2.3- Espectroscopia na Região de Infravermelho (IV)

Os espectros foram obtidos através de um Espectrômetro de Absorção na Região do Infravermelho, modelo 2000 Ft-IR, da Perkin – Elmer. Os dados foram coletados com intervalos de $0,5\text{ cm}^{-1}$. Os espectros de infravermelho foram feitos em duas regiões de frequências diferentes: $4000\text{-}370\text{ cm}^{-1}$ e $710\text{-}30\text{ cm}^{-1}$. Para a região de alta frequência ($4000\text{-}370\text{ cm}^{-1}$), foram feitas pastilhas dos compostos com KBr e para a região de baixa, as pastilhas eram preparadas com polietileno. Essa técnica é usada de forma comparativa, analisando os deslocamentos e surgimento de novas bandas no espectro dos compostos formados, em comparação com as dos compostos de partida. Através dessa comparação, obtêm-se informações sobre a estrutura do complexo formado.

3.2.4- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H (300 MHz), em solução de DMSO, foram obtidos no Departamento de Química do IME, em colaboração com a aluna de Pós-Doc **Tatiana Santana Ribeiro** (PUC-Rio) e o Prof. Dr. **José Daniel Figueroa-Villar** (IME). Foi utilizado um espectrômetro de marca Unity-300 (Varian), em sonda de 5 mm (IME). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e o solvente, DMSO-*d*₆, na solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades de partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). Quando necessário foi utilizado controle de temperatura da análise, com precisão de $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C no estado sólido foram obtidos no Departamento de Química da UFRJ, em colaboração com a Profa. **Rosane A. S. San Gil**. Foi utilizado um espectrômetro Bruker DRX-400 Avance (100 MHz para o núcleo de carbono 13) e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades de partes por milhão (ppm).

3.2.5- Estudos de Modelagem Computacional

Os estudos de modelagem computacional foram efetuados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Luiz Antônio Sodré Costa (Núcleo de Estudos em Química Computacional – DQ – UFJF, Juiz de Fora). Foi realizado um estudo estrutural e espectroscópico para o complexo (**1**). Os parâmetros moleculares foram totalmente otimizados na fase gasosa sem nenhuma restrição geométrica pela Teoria do Funcional de Densidade (DFT), usando o pacote Gaussian 03, revisão D.01. O método do DFT aplicado foi o do funcional híbrido B3LYP (uma combinação parametrizada do funcional de intercâmbio de Beck e o funcional de correlação de Lee, Yang e Parr). Assim, o nível de teoria usado neste trabalho foi B3LYP/6-311+G(2d,p)/LANL2DZ. As frequências harmônicas de vibração foram calculadas para garantir que as geometrias otimizadas fossem mínimos locais de energia.

3.2.6- Ensaio de Atividade Citotóxica

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

As células da linhagem K562 foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro (número CR083 da coleção do BCRJ). Elas foram retiradas por efusão pleural de uma mulher de 53 anos com leucemia mielóide crônica em crise terminal blástica. A linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (CULTLAB, São Paulo) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera de CO_2 umidificada a 5%. As culturas celulares crescem de forma exponencialmente de 10^5 células/mL para cerca de 10^6

células/mL em 3 dias. A viabilidade celular foi checada por exclusão com azul de Trypan. Para a avaliação da citotoxicidade, 1×10^5 células/mL foram cultivadas por 72h na ausência e na presença de diferentes concentrações do composto de platina. A atividade do composto **(1)** foi avaliada pela concentração que inibe o crescimento celular em 50%, IC_{50} . Uma solução estoque do composto **(1)** foi preparada em DMSO (dimetilsulfóxido). A concentração final de DMSO nos experimentos com as células foi abaixo de 0,5% e foi checado que o solvente não causa nenhum efeito no crescimento celular nessa concentração.

4- Resultados e Discussão

A reação entre o tetracloroplatinato(II) de potássio e o ligante PZA deu origem a um sólido de coloração amarelo-pálida **(1)**, o qual foi completamente caracterizado pelas técnicas acima descritas. Deste complexo inédito, foi possível isolar outro composto inédito, o composto **(2)**, que em sua estrutura troca uma das moléculas do ligante PZA por uma molécula de DMSO. A composição desse composto também foi determinada através dos resultados obtidos por análise elementar de CHN e espectroscopia na região de infravermelho.

Do composto **(1)** também foram feitos estudos de atividade citotóxica, assim como um estudo de modelagem computacional, que forneceu maiores informações sobre a sua estrutura. A discussão dos resultados obtidos segue abaixo.

4.1- Análise Elementar (CHN)

A análise elementar indica, através das porcentagens de massa obtidas (para carbono, nitrogênio e hidrogênio), que a possível fórmula molecular do composto **(1)** é a seguinte: $[PtCl_2(C_5H_5ON_3)_2] \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$. Para o composto **(2)**, propõe-se que a fórmula molecular seja $[PtCl_2(C_5H_5ON_3)(C_2H_6OS)]$. Abaixo segue uma tabela que resume os resultados obtidos nas análises e mostra a concordância entre os valores encontrados experimentalmente e os cálculos teóricos das porcentagens levando em consideração as fórmulas moleculares propostas.

Tabela 1. Porcentagens obtidas na análise elementar (valores calculados entre parênteses)

Complexos	%C		%N		%H	
$[PtCl_2(C_5H_5ON_3)_2] \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$ (1)	22,1	(22,3)	15,0	(15,6)	2,5	(2,4)
$[PtCl_2(C_5H_5ON_3)(C_2H_6OS)]$ (2)	19,6	(18,0)	9,8	(9,0)	2,3	(2,4)

4.2- Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

A termogravimetria mostra que o complexo **(1)** passa por quatro fases de decomposição até a formação de um resíduo estável em torno de 850 °C. Inicialmente, o composto **(1)** perde água na faixa de temperatura 40-95 °C; a porcentagem de perda de massa está em boa concordância com o número de moléculas de água de hidratação proposto. Após mais três etapas de decomposição térmica, é observado, acima de 850 °C, um resíduo estável correspondente a 36,5% da massa inicial, que foi atribuído à Pt elementar. A porcentagem de Pt calculada com base na fórmula proposta é de 36,2%. Esse resultado é mais uma indicação que a fórmula molecular proposta está correta.

4.3- Espectroscopia na Região de Infravermelho (IV)

O espectro vibracional (IV) do ligante livre pirazinamida possui as bandas de seu espectro já determinadas na literatura, assim como as bandas do DMSO [9, 10]. Através dessas informações e das atribuições feitas para as bandas dos espectros vibracionais dos complexos **(1)** e **(2)**, podemos realizar uma comparação entre as bandas do ligante e do complexo, verificando se houve algum deslocamento nas frequências de vibração, ou então o surgimento de novas bandas no espectro do complexo. Abaixo segue uma tabela contendo as bandas de interesse do ligante PZA, do DMSO, do composto **(1)** e do composto **(2)**:

Tabela 2. Principais frequências vibracionais (cm^{-1}) e atribuições para as bandas do espectro de infravermelho dos ligantes PZA e DMSO e dos complexos **(1)** e **(2)**

Atribuições	PZA	DMSO	Composto (1)	Composto (2)
ν (O-H)	-	-	3547	-
ν_{ass} NH_2	3414	-	**	**
ν_{sim} NH_2	3290	-	3294	**
ν_{ass} (C-H)	-	3000	-	2999
ν_{sim} (C-H)	-	2918	-	2914
ν (C=O)	1714	-	1677	1654
ν_{ring}	1524	-	1525	1525
ν_{ring}	1478	-	1469	1478
ν_{ring}	1438	-	1434	**
ν (S=O)	-	1055	-	1124
ν_{ass} (C-S)	-	690	-	700
ν_{sim} (C-S)	-	661	-	665
ν (Pt-S)	-	-	-	447
ν (Pt-O)	-	-	403	409
ν (Pt-Cl)	-	-	335	329
ν (Pt-Cl)	-	-	325	315

Como pode ser visto acima, o espectro vibracional (IV) do ligante PZA livre possui bandas de interesse em 3414 (ν_{ass} NH_2), 3290 (ν_{sim} NH_2), 1714 (ν C=O) e três absorções em 1524, 1478 e 1438 cm^{-1} , características de deformações axiais ν C=C e ν C=N do anel aromático. No espectro do complexo **(1)**, a banda referente à deformação axial C=O é fortemente deslocada para uma região de menores frequências (1677 cm^{-1}), indicando o envolvimento da carbonila na coordenação. Por outro lado, as demais bandas não sofrem grandes alterações, o que sugere que o anel heteroaromático e o grupo amino não participam ativamente do processo de complexação. Portanto, chega-se a conclusão que o PZA atua como um ligante monodentado no composto **(1)**. A presença de água de hidratação no complexo é evidenciada pelo surgimento de uma banda fina em 3547 cm^{-1} (ν O-H). Na região de baixas frequências ($< 700 \text{ cm}^{-1}$), o aparecimento de bandas de deformação axial platina-oxigênio confirma a formação do complexo: 403 cm^{-1} (ν Pt-O). A presença de duas absorções para o modo vibracional ν Pt-Cl, em 335 e 325 cm^{-1} , sugere uma geometria do tipo *cis* em torno do centro metálico.

Já no espectro IV do ligante DMSO, as bandas de interesse se encontram em 3000 ($\nu_{\text{ass}} \text{C-H}$), 2918 ($\nu_{\text{sim}} \text{C-H}$), 1055 ($\nu \text{S=O}$), 690 ($\nu_{\text{ass}} \text{C-S}$) e 661 ($\nu_{\text{sim}} \text{C-S}$) cm^{-1} . Segundo a literatura, compostos de platina que se ligam à molécula de DMSO pelo enxofre apresentam um aumento na frequência de deformação axial S=O em relação ao ligante livre [11]. Pode-se ver que isso ocorre no composto (2), em que a frequência de deformação axial do ligante livre, localizada originalmente em 1055 cm^{-1} , desloca-se para uma frequência de vibração maior em 1124 cm^{-1} . A confirmação do envolvimento do enxofre no processo de coordenação se dá pelo surgimento de uma banda na região de baixas frequências em 447 cm^{-1} , atribuída à deformação axial $\nu \text{Pt-S}$. No caso das bandas de deformação axial C-H, percebe-se que não sofreram grandes alterações, e servem mais para confirmar que o complexo (2) está realmente ligado a uma molécula de DMSO, uma vez que o ligante pirazinamida não apresenta hidrogênios alifáticos.

Comprova-se que ainda temos uma molécula de PZA ligada à platina ao analisarmos a presença de uma banda forte em 1654 cm^{-1} , comumente atribuída na literatura a uma deformação axial C=O. Outras indicações são as bandas em 1525 e 1478 cm^{-1} , atribuídas às deformações axiais do anel heteroaromático, indicando a presença do anel, e que, já que não se observa grandes variações nos valores em relação ao PZA livre, o anel não participa da complexação. Outra indicação é uma banda na região de baixas frequências em 409 cm^{-1} , que pode ser atribuída à deformação axial $\nu \text{Pt-O}$.

A presença de duas absorções para o modo vibracional $\nu \text{Pt-Cl}$, observadas em 329 e 315 cm^{-1} , sugere que manteve-se uma geometria do tipo *cis*, dando um maior suporte à proposta de que realmente uma molécula de PZA foi substituída pela molécula de DMSO e que ambos os cloretos ainda encontram-se ligados à platina.

Com base em todos os resultados discutidos acima, foi possível propor fórmulas estruturais para os dois compostos inéditos sintetizados, as quais seguem abaixo:

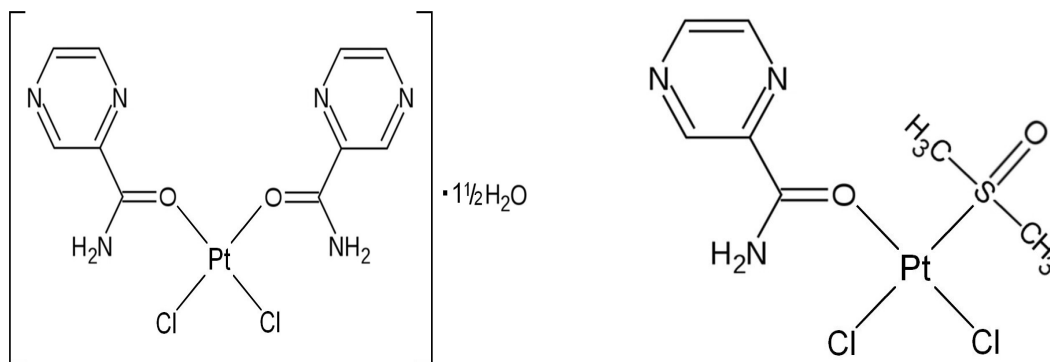


Figura 4. Fórmulas estruturais propostas para os complexos *cis*-[PtCl₂(C₅H₅ON₃)₂]·1/2H₂O (esquerda) e *cis*-[PtCl₂(C₅H₅ON₃)(C₂H₆OS)] (direita).

4.4- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise do RMN, assim como com os resultados do IV, é feita comparando-se os resultados obtidos para o ligante livre com os do complexo. Analisando os deslocamentos nos sinais obtidos, conseguem-se informações precisas sobre como ocorreu a coordenação no composto analisado.

Neste trabalho, as análises foram feitas com núcleos diferentes (¹H, em solução de DMSO, e ¹³C, no estado sólido). As análises feitas remetem apenas ao composto (1).

Ressonância Magnética Nuclear de ^1H em Solução

Nesta análise, obtiveram-se informações referentes aos núcleos de hidrogênio do PZA livre e do complexo *cis*-[PtCl₂(C₅H₅ON₃)₂] \cdot 1/2H₂O. Os hidrogênios ligados ao nitrogênio da amida receberam os índices A e B. Os demais, do anel pirazínico, foram identificados em função de sua posição no heterociclo, segundo as regras da IUPAC (Figura 5).

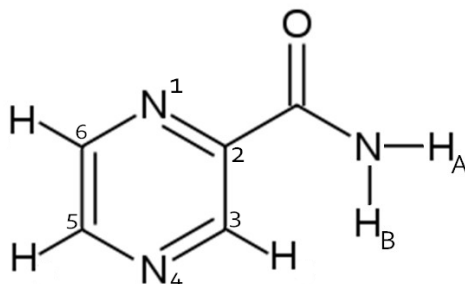


Figura 5. Representação da identificação feita para os hidrogênios da molécula do PZA.

Abaixo segue uma tabela que resume os resultados obtidos pela análise. A partir dessas informações podemos obter mais informações sobre a estrutura do composto (**1**).

Tabela 3. Informações obtidas pela análise de RMN de ^1H do PZA e do composto (**1**)

H	δ	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	Deslocamento (ppm)	
A,B	7,79 8,26	s	-	2	- -	Ligante
5	8,63	dd	1,5 / 2,5	1	-	
6	8,85	d	2,5	1	-	
3	9,18	d	1,5	1	-	
A,B	8,07 8,4	-	-	2	0,28 0,14	
5	8,72	-	-	1	0,09	
6	9,07	-	-	1	0,22	
3	9,43	-	-	1	0,25	

A análise dos hidrogênios será feita considerando os deslocamentos dos sinais em relação à molécula de PZA livre e do composto (**1**). Quanto maior for o deslocamento, maior é a possibilidade da região em volta do hidrogênio analisado estar envolvida na coordenação. Chega-se a essa conclusão, pois os sinais obtidos pela análise por RMN são indicadores de como os núcleos analisados estão blindados, ou não, por elétrons a sua volta. A incidência do campo elétrico gerado pelo aparelho será maior ou menor no núcleo dependendo dessa blindagem, e assim, quanto menor a blindagem, maior a atuação do campo magnético e maior será o deslocamento químico do sinal obtido.

O aumento observado nos sinais de todos os hidrogênios do composto (**1**) está relacionado com a perda de densidade eletrônica da molécula em função da coordenação, afinal a platina irá atrair os elétrons da molécula, e assim o efeito de blindagem será menor em todos os núcleos de hidrogênio.

Primeiramente, vamos analisar os resultados obtidos para os hidrogênios A e B. Foram obtidos dois sinais, cada um referente a um dos dois hidrogênios da amida. Como foram obtidos dois sinais, esse fato indica uma conclusão interessante. Esperava-

se obter apenas um sinal, tendo em vista que, a ligação entre o nitrogênio e o carbono da amida, a qual, inicialmente, acreditava-se que fosse do tipo simples, a análise iria indicar apenas um sinal, possivelmente a média entre os valores obtidos. A obtenção de dois sinais indica que, em função da ressonância na molécula, a ligação entre o carbono e o nitrogênio apresenta características de ligação dupla, dando maior rigidez à ligação e dessa forma não possibilitando a rotação esperada na ligação carbono-nitrogênio.

O pequeno deslocamento no sinal do hidrogênio H₅ (0,09 ppm) indica que a região em volta não está participando da coordenação, ou seja, a complexação não está ocorrendo através do nitrogênio vizinho ao carbono ligado ao H₅. Como pode ser visto na tabela 3, os hidrogênios 3 e 6 apresentaram deslocamentos consideráveis (0,25 e 0,22 ppm, respectivamente), sendo que aquele na posição *orto* ao carbono ligado à amida (H₃), conseqüentemente mais perto do oxigênio, é o que apresentou maior deslocamento. Este fato é mais um indício de que a platina está realmente ligada ao PZA pelo oxigênio no composto (**1**), e por isso os núcleos mais próximos ao sítio de coordenação sofrem com uma maior perda de densidade eletrônica. Ainda no complexo, os hidrogênios A e B são afetados de forma diferente pela coordenação, o que é um indicativo do não-envolvimento do nitrogênio de amida na coordenação ao metal.

Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C no Estado Sólido

Para o RMN de ¹³C no estado sólido também valem os conceitos teóricos relacionados com os efeitos de blindagem acima discutidos.

Através do RMN de ¹³C no estado sólido teremos mais informações sobre a estrutura do composto (**1**), podendo analisar a influência da coordenação nos núcleos de carbono da molécula. Os resultados obtidos estão representados na tabela abaixo.

Tabela 4. Deslocamentos químicos (ppm) para o núcleo de carbono ¹³C no ligante livre e no composto (**1**)

PZA	Composto (1)	Referente ao
143,5	147,1	C6
143,5	147,1	C3
148,6	153,9	C2
148,6	153,9	C5
167,3	165,3	C=O

O espectro de ¹³C por CPMAS (Charge Polarized Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance) mostra que todos os carbonos do anel pirazínico sofreram um aumento nos seus deslocamentos químicos. A doação de elétrons pelo sistema sigma do oxigênio carbonílico da amida para a platina promove a desblindagem de todos os núcleos de carbono da molécula, o que leva a um aumento do sinal obtido. A única exceção é precisamente o carbono da carbonila, cujo sinal deslocou-se de 167,3 (no PZA livre) para 165,3 ppm após coordenação. Para explicar esse fenômeno, foi sugerido que este efeito esteja relacionado com a retrodoação de densidade eletrônica da platina para o orbital π* antiligante do grupo C=O, através do sistema π. Percebe-se novamente que os resultados obtidos corroboram a estrutura molecular proposta.

4.5- Modelagem Computacional

A modelagem computacional foi importante para confirmar as proposições feitas em relação à estrutura do composto (**1**). Os cálculos teóricos realizados levaram em consideração a molécula e suas possíveis interações no estado gasoso. Com os resultados teóricos obtidos pôde-se obter novas confirmações sobre a estrutura da

molécula e comparar as propostas teóricas com os resultados experimentais obtidos pelas análises acima discutidas. A modelagem estrutural foi feita e também foram calculadas as distâncias de todas as ligações da molécula. A fim de facilitar a análise, cada elemento do complexo também foi identificado por um número.

A partir dos cálculos feitos chegou-se a conclusão que o composto **(1)** pode apresentar dois possíveis confôrmeros que diferem principalmente na rotação do anel pirazínico em torno das ligações entre os carbonos C7-C9 (anel da esquerda) e C6-C11 (anel da direita). Essa pequena diferença interfere no comprimento das ligações e na própria estabilidade do composto. A representação da modelagem estrutural segue abaixo (Figura 6). Para facilitar a visualização do composto, os elementos da molécula também foram indicados por cores diferentes: os carbonos na figura estão em cinza, os hidrogênios em branco, os nitrogênios em azul escuro, os oxigênios em vermelho, a platina em azul e os cloros em verde.

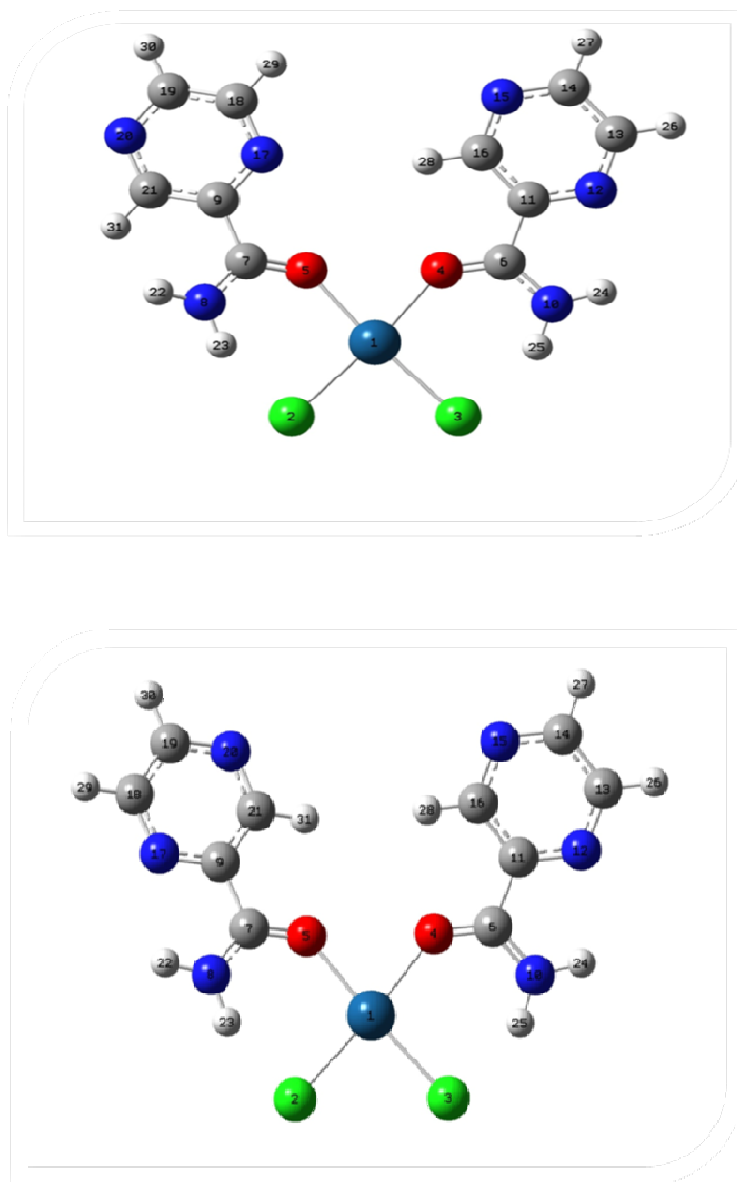


Figura 6. Estruturas calculadas para os confôrmeros 1 e 2, respectivamente, de **(1)** em fase gás.

Como pode ser visto nas figuras acima, o confôrmere 2 apresenta maior simetria em sua estrutura e esse fato vai influenciar no comprimento das ligações (Tabela 5). Percebe-se que o confôrmere mais simétrico apresenta essa simetria também em algumas de suas ligações. Por exemplo, o comprimento das ligações entre a platina e o cloreto, que no confôrmere 2 apresenta valores iguais nas duas ligações (2,341 ppm), enquanto que no confôrmere 1, essas ligações apresentam valores diferentes.

Tabela 4. Valores calculados para o comprimento das ligações (em Å) para os dois possíveis confôrmere

Confôrmere (1)		Confôrmere (2)	
Pt-Cl(2)	2,343	Pt-Cl(2)	2,341
Pt-Cl(3)	2,340	Pt-Cl(3)	2,341
Pt-O(5)	2,114	Pt-O(5)	2,116
Pt-O(4)	2,099	Pt-O(4)	2,116
O(4)-C(6)	1,250	O(4)-C(6)	1,252
O(5)-C(7)	1,244	O(5)-C(7)	1,252
C(6)-N(10)	1,324	C(6)-N(10)	1,323
C(7)-N(8)	1,333	C(7)-N(8)	1,323
N(10)-H(24)	1,010	N(10)-H(24)	1,009
N(10)-H(25)	1,021	N(10)-H(25)	1,022
N(8)-H(22)	1,006	N(8)-H(22)	1,010
N(8)-H(23)	1,024	N(8)-H(23)	1,021
C(6)-C(11)	1,498	C(6)-C(11)	1,500
C(11)-C(16)	1,399	C(11)-C(16)	1,397
C(16)-H(28)	1,084	C(16)-H(28)	1,083
C(16)-N(15)	1,335	C(16)-N(15)	1,334
N(15)-C(14)	1,334	N(15)-C(14)	1,333
C(14)-H(27)	1,086	C(14)-H(27)	1,086
C(14)-C(13)	1,396	C(14)-C(13)	1,397
C(13)-H(25)	1,086	C(13)-H(26)	1,086
C(13)-N(12)	1,331	C(13)-N(12)	1,330
N(12)-C(11)	1,336	N(12)-C(11)	1,337
C(7)-C(9)	1,504	C(7)-C(9)	1,500
C(9)-N(17)	1,337	C(9)-N(17)	1,337
N(17)-C(18)	1,329	N(17)-C(18)	1,330
C(18)-H(29)	1,086	C(18)-H(29)	1,086
C(18)-C(19)	1,398	C(18)-C(19)	1,397
C(19)-H(30)	1,086	C(19)-H(30)	1,086
C(19)-N(20)	1,331	C(19)-N(20)	1,333
N(20)-C(21)	1,334	N(20)-C(21)	1,384
C(21)-H(31)	1,086	C(21)-H(31)	1,083
C(21)-C(9)	1,399	C(21)-C(9)	1,397
H(28)...N(17)	3,279	H(28)...H(31)	2,794
H(23)...Cl(2)	2,178	H(23)...Cl(2)	2,197
H(25)...Cl(3)	2,210	H(25)...Cl(3)	2,166

O confômero 2, mais simétrico, é cerca de 7,15 kcal/mol mais estável que o confômero 1 na fase gás.

O espectro vibracional teórico também foi calculado, mas apenas para o confômero mais estável, e este comparado com o espectro teórico do ligante livre na fase gás. Esses resultados teóricos podem ser comparados com aqueles obtidos pela espectroscopia de infravermelho. Na tabela abaixo (Tabela 5) pode-se perceber a disparidade entre os valores obtidos pelos cálculos e pelo IV para a frequência de deformação axial da carbonila, mas de certa forma isso já era esperado. Os cálculos realizados consideravam a molécula no estado gasoso, no qual pode-se dizer que ela está mais livre e dispersa no gás, onde a chance dela realizar e a possíveis interações com outras moléculas que podem interferir na frequência de vibração é menor; o que é bem diferente do que ocorre no estado físico do composto no momento da análise de infravermelho. No estado sólido, as interações com as moléculas vizinhas, e a própria estrutura mais compacta que o composto apresenta nesse estado com certeza influencia em sua frequência de vibração.

Tabela 5. Valor teórico e experimental, em cm^{-1} , para a frequência de deformação axial $\nu(\text{C}=\text{O})$ para o PZA e o complexo (1)

$\nu(\text{C}=\text{O})$	PZA	Complexo (1)	Deslocamento
Teórico	1759	1714	45
Experimental	1714	1677	37

Mas apesar dessa disparidade, os cálculos serviram como mais uma confirmação de que, a carbonila de fato está envolvida na coordenação. Independente de o composto estar no estado gasoso ou sólido, a coordenação iria causar um deslocamento da frequência de vibração da carbonila bem semelhante. Se analisarmos a variação das frequências de vibração, percebe-se que os valores obtidos tanto na teoria como na parte experimental são bem próximos (45 vs. 37 cm^{-1}), confirmando assim a proposta de coordenação.

4.6- Citotoxicidade

Estudos de citotoxicidade em células tumorais indicam que o composto consegue inibir o seu crescimento de maneira dependente da concentração (Figura 8). 36,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de **1** são necessários para inibir 50% de crescimento celular.

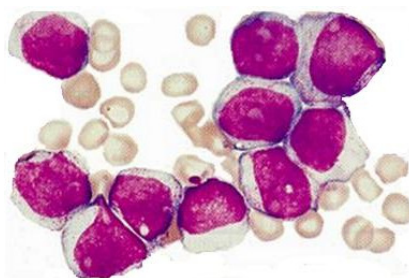


Figura 7. Células tumorais humanas da linhagem K562 vistas ao microscópio.

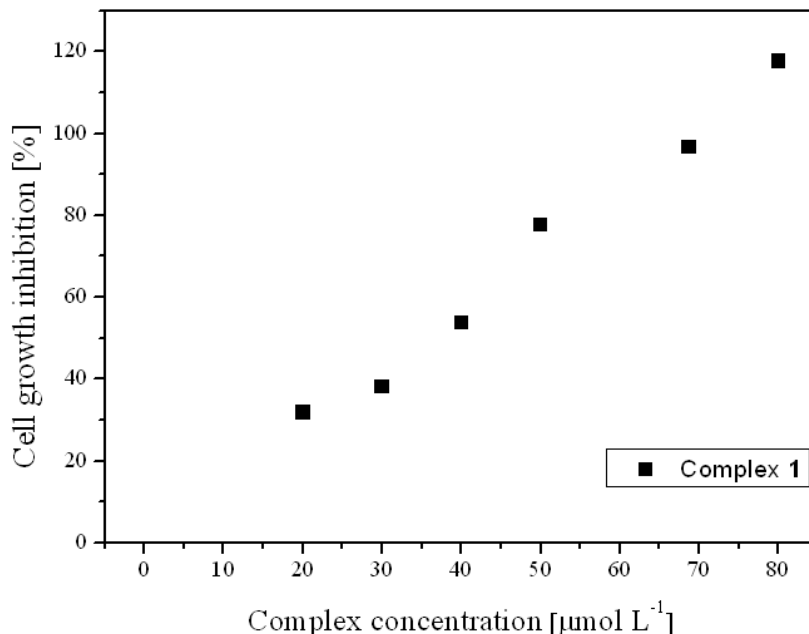


Figura 8. Inibição do crescimento celular em função da concentração molar de (1).

5- Conclusões

Como foi proposto neste projeto de pesquisa, foi possível obter dois novos complexos de platina(II) com possíveis atividades antitumorais, partindo do ligante escolhido pirazinamida: *cis*-[PtCl₂(PZA)₂] \cdot 1½H₂O (1) e *cis*-[PtCl₂(DMSO)(PZA)] (2). Através das técnicas de caracterização utilizadas, foi possível propor a estrutura molecular desses complexos inéditos. Com o composto (1) também foram realizados estudos de citotoxicidade e de modelagem computacional.

A análise de infravermelho mostra que, em ambos os complexos, a molécula de PZA está ligada à platina pela carbonila de forma monodentada e que ambos os compostos isolados apresentam a conformação *cis*. Pelo IV também foi confirmada a entrada de uma molécula de DMSO substituindo uma molécula de PZA no composto (2). A RMN de ¹H e ¹³C confirmou as estruturas propostas.

A modelagem computacional de 1 mostra a existência de dois possíveis confôrmeros que se diferenciam pela rotação do anel de uma das moléculas de PZA. Obtiveram-se os comprimentos das ligações das duas conformações, e foi calculado que o confôrmero 2, mais simétrico, também é aquele mais estável. Deste foram realizados novos cálculos para se determinar as frequências de vibração de deformação axial de algumas ligações principais da molécula, assim como os deslocamentos químicos para ¹H e ¹³C. As informações obtidas por esses cálculos reforçaram a estrutura molecular proposta para o composto (1).

O estudo citotóxico mostra que é necessária uma concentração de 36,1 $\mu\text{mol/L}$ do complexo (1) para inibir o crescimento celular em 50% (IC₅₀) de células tumorais humanas da linhagem K562. Estudos complementares estão sendo feitos para que em seguida sejam realizados os testes citotóxicos com o complexo (2). Acredita-se na possibilidade de que ele seja a forma farmacologicamente ativa de (1).

6- Referências

- [1] Fontes, A. P. S.; César, E. T. e Beraldo, H. “A Química Inorgânica na Terapia da Câncer”, *Química Nova na Escola*, nº 6, julho 2005.
- [2] Reedjik, J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2499-2510.
- [3] D. Sriram *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 2113–2116
- [4] Sreevatsan, S.; Pan, X.; Stockbauer, K. E.; Connell, N. D.; Kreiswirth, B. N.; Whittam, T. S. e Musser, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9869–9874 (1997).
- [5] Smith, C. V.; Sharma, V. e Sacchetti, J. C. *Tuberculosis* **84**, 45–55 (2004).
- [6] de Souza, M. V. N. e Vasconcelos, T. R. A. *Quim. Nova* **28**(4), 678-682 (2005)
- [7] Graef, L. E. Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico Quantitativo por Eletroforese Capilar para Tuberculostáticos de Primeira Escolha. Universidade Federal do Paraná.
- [8] Frieden, T. R. e Driver, C. R. *Tuberculosis* **83** (1-3), 82-85 (2003).
- [9] S. Akyuz *et al.* *Journal of Molecular Structure* **834–836** (2007) 399–402.
- [10] Cotton, F. A.; Francis, R. e Horrocks Jr, W. D. *J. Phys. Chem.*, **64**, 1534 (1960).
- [11] Melanson, R. e Rochon, F. D. *Can. J. Chem.* **53**, 2371 (1975).

7- ANEXO – Comunicação dos Resultados

Parte dos resultados deste trabalho foi apresentada na forma de pôster na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e aceita para apresentação ORAL no XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, a ser realizado em agosto deste ano.