

RELATÓRIO - PIBIC

NOVO COMPLEXO DE PLATINA(II) DA ISONIAZIDA: POTENCIAL AGENTE ANTIMICROBIANO E ANTINEOPLÁSICO

**Aluna: Bruna O. Pires
Orientador: Nicolás A. Rey**

Rio de Janeiro, julho de 2011

Índice

1 - Introdução

2 - Objetivo

3 - Parte experimental

3.1 - Síntese

3.2 - Caracterizações e resultados das análises

3.2.1 - Análise elementar (CHN)

3.2.2 - Espectroscopia na região de infravermelho (IV)

3.2.3 - Análise termogravimétrica

3.2.4 - Ressonância magnética nuclear (RMN)

3.2.5 - Ensaio de atividade citotóxica

4 - Discussão dos resultados

5 - Conclusão

6 - Referências

1 - Introdução

O câncer é uma doença causada pela multiplicação descontrolada de células anormais. É a segunda maior causa de morte, uma em cada quatro pessoas adquire a doença e uma em cinco morrerá. O Ministério da Saúde estima que em 2005 sejam registrados 467.440 novos casos de câncer em todo o Brasil. Os três principais tipos de tratamento do câncer são a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia, sendo esta última objeto de estudo nas últimas quatro décadas. Atualmente a quimioterapia do câncer utiliza-se tanto de compostos orgânicos quanto de complexos metálicos, como a cisplatina, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], e carboplatina (Figura 1).

Em 1844 o complexo *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] foi descrito por Reiset e um ano depois um outro complexo com a mesma fórmula molecular por Peyrone, e apenas em 1893 Werner propôs serem os dois compostos isômeros. Entretanto, as propriedades antitumorais de compostos contendo platina só foram descobertas mais de um século após a descrição dos compostos de Reiset e Peyrone, no final da década de 60 do século XX. A cisplatina é hoje em dia um dos compostos mais utilizados no tratamento do câncer, a descoberta de suas propriedades antitumorais deu impulso ao estudo de complexos metálicos para uso na quimioterapia.

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, provocando a morte das células tumorais ao bloquear os processos de replicação e transcrição do DNA, impedindo a síntese de novas células cancerígenas. Contudo, o uso da cisplatina tem trazido problemas, como o surgimento de resistência celular, baixa solubilidade em água, estreito espectro de atividade e graves efeitos colaterais. Com isso, mais de 3000 mil compostos de platina já foram sintetizados e submetidos a ensaios antitumorais.

A carboplatina é uma droga da segunda geração de compostos de platina que apresenta uma menor toxicidade em relação a cisplatina, devido à presença de um grupamento orgânico em sua estrutura, mas apresenta atividade antitumoral menor.

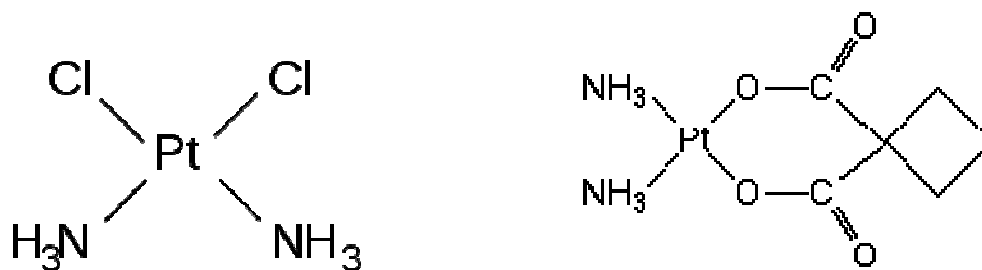


Figura 1. Cisplatina (A) e Carboplatina(B).

Chamada antigamente de peste cinzenta, a tuberculose é uma doença causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, ou bacilo de Koch, que normalmente afeta os pulmões. É uma das infecções mais comuns e mortais que é documentada na história. Existem relatos dos médicos clássicos da Grécia e de Roma sobre a doença e, em estudos mais recentes, pesquisadores encontraram lesões de tuberculose em múmias do antigo Egito.

É uma doença contagiosa, transmissível, que ataca o homem e compromete principalmente os pulmões, embora possa se localizar em qualquer parte do corpo. A transmissão se dá de pessoa a pessoa, através da tosse, fala e espirro, pois nessas situações o doente elimina bacilos no ar. Os bacilos são aspirados por outra pessoa e vão se instalar no pulmão, onde podem desenvolver o foco inicial da doença.

Os tratamentos recentes para a tuberculose ativa incluem uma combinação de drogas, não se utiliza apenas uma droga, pois dessa forma todas as bactérias sensíveis a ela morreriam, e três meses depois, o paciente sofreria uma infecção de bactérias que conseguiram resistir a esta primeira droga. Alguns medicamentos matam a bactéria, outros agem contra a bactéria infiltrada em células, e outros, ainda, impedem a sua multiplicação.

A tuberculose é contagiosa e é classificada no grupo das doenças ditas negligenciadas, pois grande parte de suas vítimas se encontram em países pobres e em desenvolvimento. Essa doença é presentemente uma emergência global, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 2010, ocorreram 8,8 milhões de novos casos e aproximadamente 1,6 milhões de mortes devido à tuberculose em todo o mundo [2], Figura 2. Não há grandes investimentos no combate a esta doença e, com isso, os fármacos atualmente

utilizados apresentam alguns problemas, como efeitos colaterais indesejados e a longa duração do tratamento.

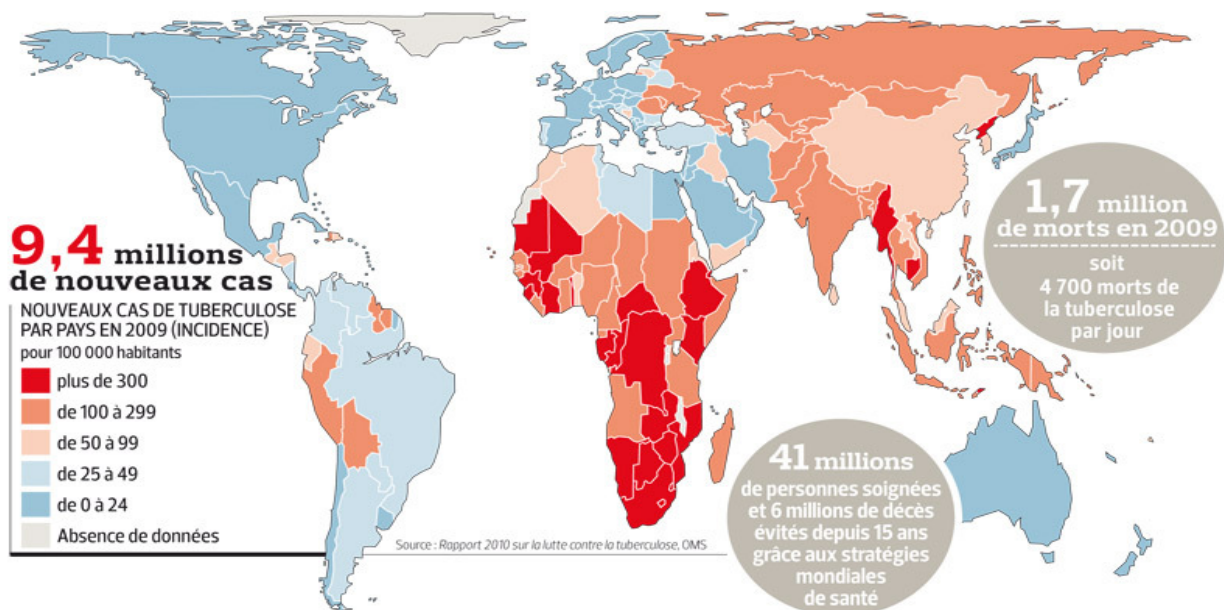


Figura 2. Casos de tuberculose no mundo em 2009.

A isoniazida (INH), sintetizada primeiramente em 1952, é um derivado sintético do ácido isonicotínico, oxidamente ativado pela enzima katG e é droga de primeira escolha no tratamento da tuberculose. Sabe-se que a interação de um antibiótico com metais pode modular a atividade biológica do antibiótico. Então, na busca por medicamentos mais eficazes para o tratamento de doenças como o câncer e a tuberculose, o presente projeto de pesquisa visa a síntese de novos complexos de coordenação de platina(II) da isoniazida, tendo em mente que a união dos potenciais biológicos de ambos, metal e INH, parece ser uma estratégia bastante promissora.

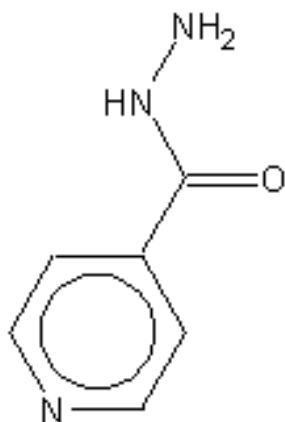


Figura 3. Estrutura da isoniazida (INH).

2 - Objetivos

Síntese e caracterização de um complexo inédito de platina(II) de INH e avaliação da sua atividade biológica como agente antitumoral.

3 - Parte experimental

3.1 – Síntese

Uma solução aquosa de $K_2[PtCl_4]$ (0,25 mmol) foi gotejada sobre outra solução, também aquosa, de INH (0,50 mmol). Esta mistura permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, por 24 horas. O precipitado resultante, de cor amarela (Figura 4), foi separado por filtração, lavado com água e éter etílico e secado no vácuo. A caracterização foi efetuada através das técnicas de análise elementar (CHN), espectroscopia vibracional (IV), termogravimetria (TG/DTG) e ressonância magnética nuclear (1H e ^{13}C CPMAS, este último no estado sólido). Ensaio de atividade citotóxica frente a linhagem de células tumorais humanas K562, em colaboração com o grupo da Professora Elene Cristina Pereira-Maia (DQ-UFGM), foram igualmente realizados.



itina(II).

3.2- Caracterizações e resultados das análises

3.2.1- Análise elementar (CHN)

Através desta análise, foram determinadas as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio do composto sintetizado INH-Pt, em um analisador elementar modelo EA 1110 da CE Instruments. Os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio são analisados por uma curva de calibração que é obtida

com padrões secos e de alta pureza, a uma temperatura de 1000 °C, tempo de queima de 600 segundos e um fluxo de gás hélio.

A análise elementar obteve como resultados 21,2% de carbono, 2,6% de hidrogênio e 12,1% de nitrogênio.

3.2.2 – Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula. Essas frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e, eventualmente, do acoplamento vibrônico.

Esses espectros foram obtidos em um espectrômetro modelo 2000 FT-IR, da Perkin – Elmer. Os espectros foram coletados na região do infravermelho médio com uma frequência de 4000-370 cm^{-1} e foram amostradas pastilhas do complexo em KBr. E, na região do infravermelho afastado, com uma frequência de 710-30 cm^{-1} e amostragem em pastilhas preparadas com polietileno.

O espectro vibracional IV da INH não-complexada possui bandas de importância em 3304 (ν NH), 3111 (ν NH₂), 1667 (ν C=O), 1634 (δ NH₂) cm^{-1} e 4 absorções em 1602, 1556, 1491 e 1411 cm^{-1} , características de estiramentos ν C=C e ν C=N do anel piridínico (Fig. 5). No espectro do complexo, as absorções referentes aos estiramentos do grupamento HN-C=O não sofrem deslocamentos apreciáveis, o que sugere que esta porção da molécula não participa da coordenação. Por outro lado, as bandas atribuídas aos modos ν e δ do grupo NH₂ terminal são deslocadas para 3242 e 1618 cm^{-1} , respectivamente, indicando envolvimento do mesmo na complexação à platina. As absorções relativas aos estiramentos do anel piridínico também se apresentam modificadas e, portanto, esse núcleo aromático deve ter certa participação no processo. A presença de água no complexo é evidenciada pelo surgimento de uma banda larga centrada em 3419 cm^{-1} (ν O-H). Na região do infravermelho afastado ($< 700 \text{ cm}^{-1}$), o aparecimento de bandas de estiramento metal-ligante confirma a formação do complexo: 531 cm^{-1} (ν Pt-NH₂), 333 cm^{-1} (banda larga e assimétrica, ν Pt-Cl) e 295 cm^{-1} (ν Pt-py) [2].

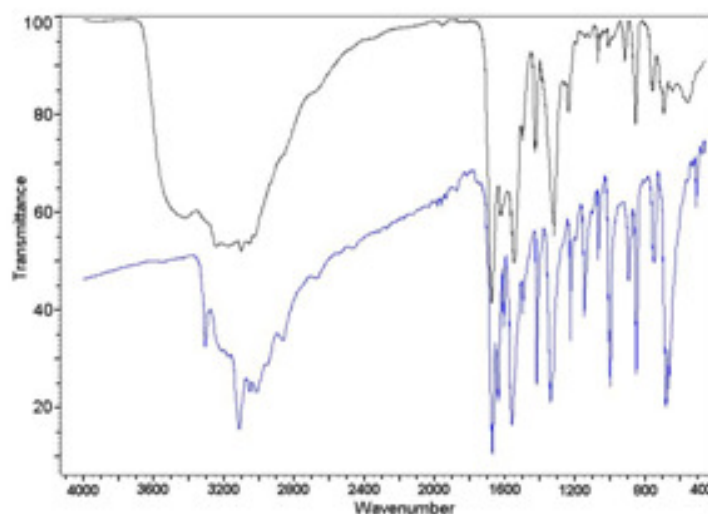


Figura 5. Espectro vibracional do complexo inédito INH-Pt.

3.2.3 – Análise termogravimétrica

Termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. Foi usada uma balança termogravimétrica Perkin – Elmer TGA 7 e analisador TA Instruments, SDT – 2960. Foi gerada por esta análise uma curva de decomposição térmica, que fornece como resultado os percentuais dos fragmentos de massa perdidos em função de uma elevação da temperatura.

A análise termogravimétrica mostrou que o complexo perde água na faixa de temperatura 25-125 °C.

3.2.4 – Ressonância magnética nuclear (RMN)

É uma técnica que permite determinar as propriedades de uma substância por correlação entre a energia absorvida e a frequência, caracterizando-se como sendo uma espectroscopia. Usa as transições entre níveis de energia rotacionais dos núcleos componentes das espécies (átomos ou íons) contidas na amostra. Necessariamente, sob a influência de um campo magnético externo e sob a irradiação de ondas de rádio.

O RMN foi obtido 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). Utilizou-se um espectrômetro da marca Unity-300

(Varian), em sonda de 5 mm (IME). A referência interna foi o tetrametilsilano (TMS) e o solvente, DMSO- d_6 . Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades de partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz). 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). Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades de partes por milhão (ppm). A seguir, o espectro de RMN de ^{13}C CPMAS do complexo INH-Pt (Figura 6).

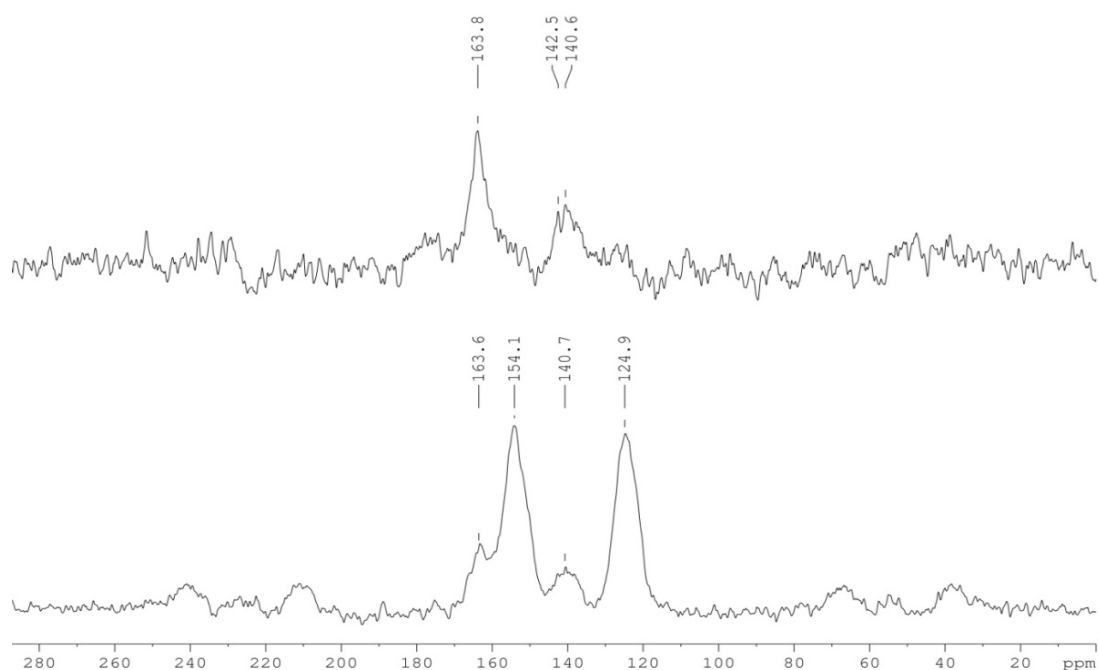


Figura 6. Espectros de RMN de ^{13}C CPMAS do complexo INH-Pt.

Os dados de RMN estão de acordo com os resultados mostrados antes e descartam o envolvimento do grupo carbonílico na coordenação.

3.2.5 – Ensaio de atividade citotóxica

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Elene Cristina Pereira-Maia (DQ – UFMG, Belo Horizonte).

Foram compradas células da linhagem K562, retiradas por efusão pleural de uma mulher de 53 anos com leucemia mielóide crônica em crise terminal blástica, do banco de células do Rio de Janeiro (número CR083 da coleção do

BCRJ). A linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (CULTLAB, SP) a 37 °C em atmosfera de CO₂ umidificada. A viabilidade celular foi checada por exclusão com azul de Trypan. Para a avaliação da citotoxicidade, 1 x 10⁵ células/mL foram cultivadas por 72 h na ausência e na presença de diferentes concentrações do composto de platina(II).

O complexo INH-Pt mostrou-se capaz de inibir o crescimento das células tumorais da linhagem K562, de maneira dependente da concentração (Figura 7). A concentração de complexo necessária para inibir o crescimento de 50% das células tumorais, parâmetro este conhecido como IC₅₀, foi igual a 0,037 g/L. Estudos adicionais sobre a acumulação celular nas condições de IC₅₀ estão em andamento para verificar a eficácia com a qual o complexo de platina é incorporado nas células.

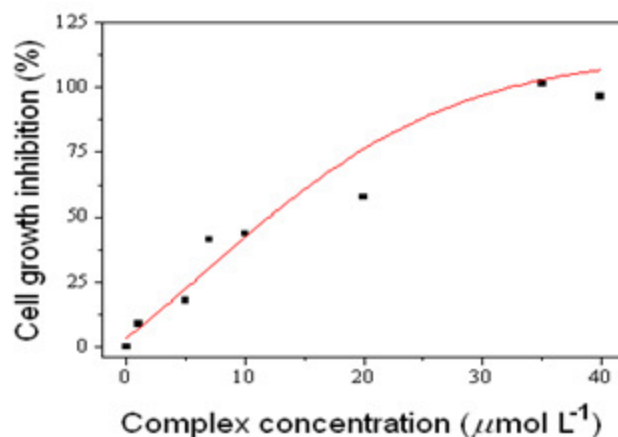


Figura 7. Ensaio citotóxico com o complexo INH-Pt envolvendo células da linhagem K562.

4 – Discussão dos resultados

Os resultados das análises feitas apontam para uma estrutura polimérica bidimensional para o complexo de platina(II) sintetizado (Figura 8). Íons cloreto livres (não mostrados na figura) atuam como intercaladores entre as diversas camadas bidimensionais, garantindo a neutralidade elétrica do conjunto.

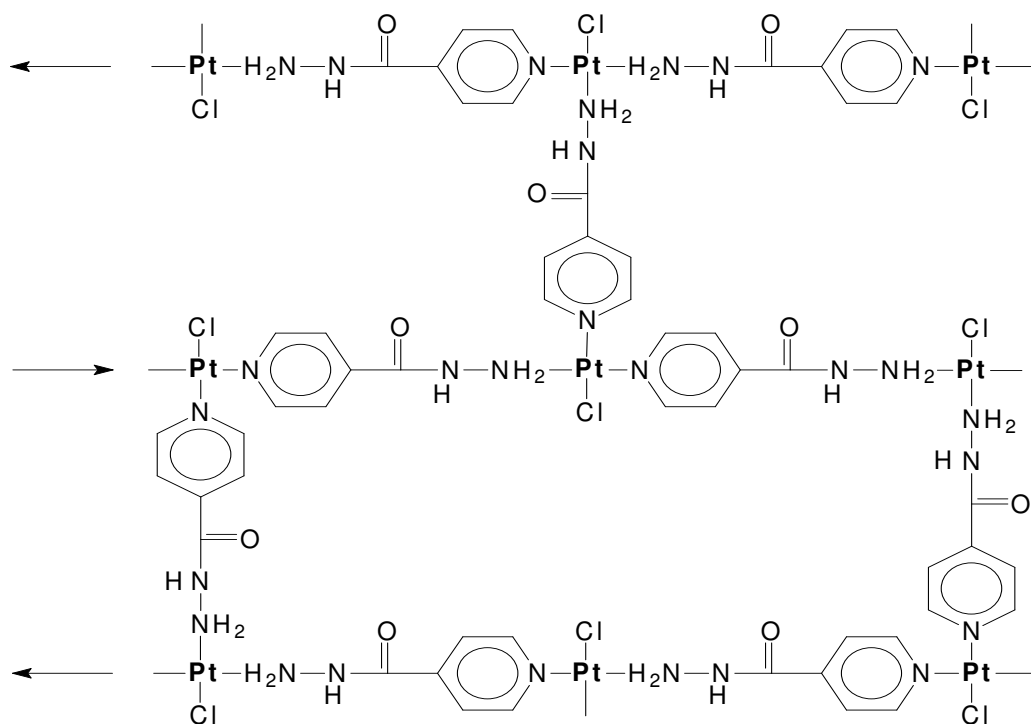


Figura 8. Estrutura proposta para o complexo inédito INH-Pt.

5 – Conclusão

O presente projeto de pesquisa tinha como objetivo inicial a síntese e caracterização de novos complexos de platina(II) da isoniazida e a avaliação do potencial antitumoral dos mesmos. Com este objetivo em mente, sintetizamos o complexo desejado, INH-Pt, pela reação entre o ânion tetracloroplatinato(II) e o ligante isoniazida, INH. O INH-Pt se mostrou um composto com grau de pureza adequado e com rendimentos satisfatórios. Fizemos análises até chegarmos a uma conclusão sobre a sua estrutura, a qual foi proposta como sendo um polímero de coordenação 2D que, em solução, se dissocia gerando espécies ativas contra as células tumorais humanas K562.

Este trabalho foi apresentado na forma de pôster na 33^o Reunião Anual da Sociedade de Brasileira de Química (SBQ) e apresentado oralmente no XV Brazilian Meeting on Inorganic chemistry (BMIC).

Foram ainda realizadas algumas tentativas de reação entre a cisplatina e o ligante isoniazida, INH, das quais não se obteve resultados conclusivos.

6 – Referências

1 - Rossi, L. M. *et al. Inorg. Chim. Acta* **2005**, 358, 1807.

2 - Site da
OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>

3 - Frieden, T. R. e Driver, C. R. *Tuberculosis* 83 (1-3), 82-85 (2003).

4 – Apostila análises térmicas, prof. Paulo A. P. Wendhausen.