

## RELATÓRIO ANUAL

### SÍNTESE DE NOVOS COMPLEXOS DE PLATINA(II) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

**Aluno: Lucas de Moraes Sartori Vieira**  
**Orientador: Nicolás A. Rey**

## Índice

- 1- Introdução
- 2- Objetivos
- 3- Parte Experimental
  - 3.1- Sínteses
    - 3.1.1- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(PZA)<sub>2</sub>] $\cdot$ 1½H<sub>2</sub>O (1)
    - 3.1.2- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(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- Ensaios 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- Ensaios de Atividade Citotóxica
- 5- Conclusões
- 6- Bibliografia

## 1- Introdução

Câncer é um termo genérico usado para um grande conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado e disseminação de células anormais para diferentes partes do organismo. Uma de suas características principais é a produção rápida dessas células anormais que crescem além de seus limites habituais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e se espalharem para outros órgãos, em um processo conhecido como metástase, sendo esta a maior causadora de mortes.

O câncer surge de uma única célula e a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral é um processo de múltiplos estágios, tipicamente uma progressão de uma lesão pré-cancerosa para tumores malignos (Figura 1). Essa transformação é resultado da combinação e interação entre fatores genéticos e agentes externos. Dentre os agentes externos, estão especificamente relacionados à exposição da pessoa a três categorias de agentes carcinogênicos: os físicos (radiações ultravioletas e ionizantes), os químicos (por exemplo, fumaça gerada pelo tabaco, arsênio, etc) e os biológicos (infecções virais, bacterianas e parasitárias) [1].

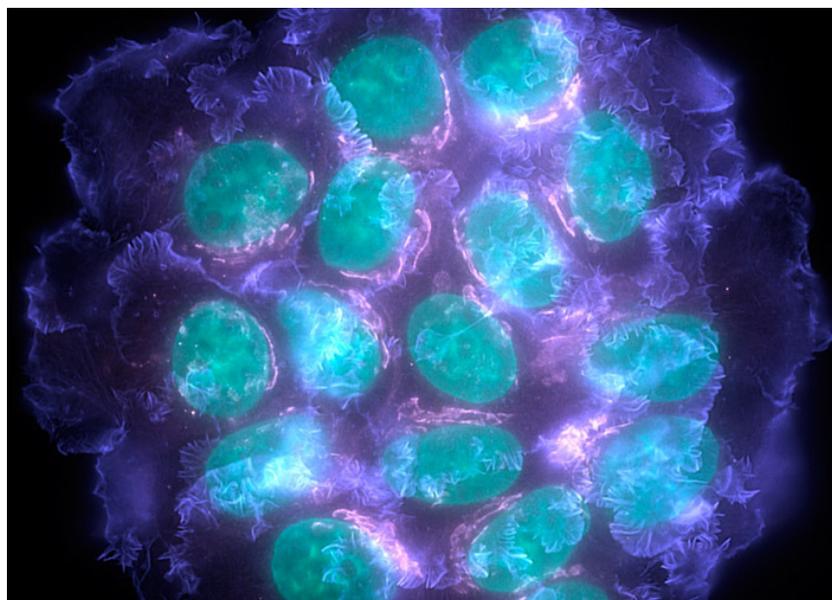


Figura 1. Imagem microscópica de um conjunto de células de câncer de mama.

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) [1], o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, responsável por 7,6 milhões (algo em torno de 13% do total de mortes) em 2008. Dados da organização indicam também que, para o ano de 2030, espera-se que o número global de mortes sofra um aumento de 45% em relação ao ano de 2007, passando de 7,9 milhões para 11,5 milhões de mortes. Outros dados preocupantes mostram também um grande crescimento no número de novos casos, passando de 11,3 milhões em 2007 para 15,5 milhões em 2030, influenciados em parte devido ao aumento da idade da população mundial, visto que o envelhecimento também é fator fundamental no desenvolvimento do câncer em função do acúmulo de riscos globais com a idade, combinado com a tendência de mecanismos de reparação celular se tornarem menos eficazes à medida que a pessoa envelhece.

Existem diferentes tipos de tratamento para o câncer, baseados geralmente no tipo e estágio em que a doença se encontra, onde por estágio de um câncer, refere-se ao quanto ele cresceu e se o tumor se espalhou ou não a partir de sua localização original. Os principais meios de tratamento envolvem cirurgia, radioterapia, quimioterapia,

terapia hormonal, ou alguma combinação desses. Entre os métodos citados, o foco deste trabalho refere-se à quimioterapia, sendo esta o tipo de tratamento de câncer mais pesquisado nas últimas quatro décadas [2].

A quimioterapia é o método que utiliza os compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral [3]. Ela pode ser usada tanto para a cura do câncer como para evitar seu espalhamento ou então para diminuir os sintomas da doença quando esta não pode mais ser curada.

No início do desenvolvimento da quimioterapia do câncer, pouco tinha-se investido no uso da química inorgânica, muito menos na utilização dos complexos metálicos, os quais inicialmente se acreditava serem prejudiciais à saúde [2]. No entanto, após a descoberta realizada em 1965 pelo físico americano Barnett Rosenberg, o estudo de complexos metálicos para uso na quimioterapia do câncer teve um grande impulso pela descoberta das propriedades antitumorais do complexo de coordenação *cis*-diaminodicloroplatina(II) (Figura 2). O sucesso deste complexo de coordenação na clínica, inicialmente em pacientes terminais e, posteriormente, em tumores localizados, como nos casos de câncer testicular e ovariano, bem como o desenvolvimento de procedimentos clínicos que diminuem a toxicidade renal, revertem a resistência inicial e renovaram o interesse na química deste composto e outros estreitamente relacionados [2].

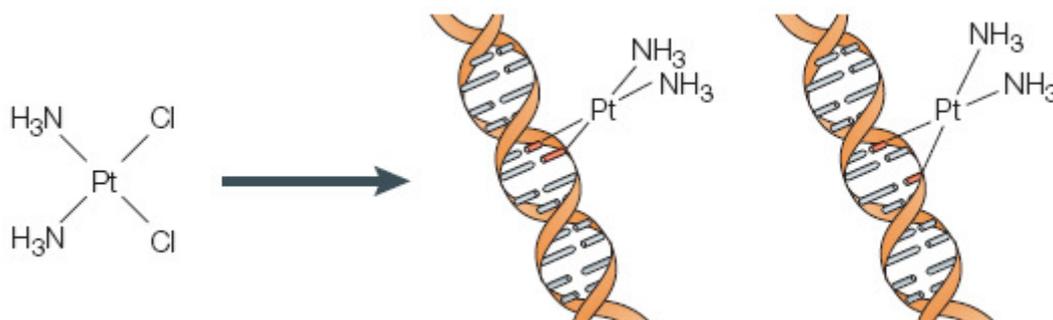


Figura 2. Ciclo de atuação da cisplatina, mostrando duas possibilidades finais de ligação ao DNA.

Focando-se especificamente no uso da química de coordenação no tratamento do câncer, vamos analisar o modo de atuação da cisplatina no tratamento do câncer.

Estudos mostram que o ciclo de atuação da cisplatina começa com sua entrada na célula principalmente por difusão passiva com sua seguida ativação pela troca de um dos cloretos, ou dos dois, por uma molécula de água, devido à baixa concentração desse íon dentro da célula [4]. A formação, em seguida, de adutos da cisplatina com as bases nitrogenadas que compõem o DNA das células é a grande responsável pela atividade citotóxica desse composto. A ligação com o DNA pode ser realizada de duas maneiras principais: pela ligação a duas bases de uma mesma fita ou em duas bases de fitas diferentes (Figura 2). Em qualquer um dos casos, essa interação promove uma leve distorção estrutural no DNA que, portanto, fica impossibilitado de realizar funções importantes para a célula, como a replicação e transcrição, que necessitam da separação das fitas do DNA. Essa impossibilidade leva à sua morte celular por apoptose e também impede a replicação das células cancerígenas, impedindo o ciclo celular [4].

Por outro lado, como em qualquer agente quimioterápico, o uso sistemático da cisplatina possui também alguns pontos negativos. Um grande número de diferentes tipos de câncer apresenta uma resistência natural ao tratamento com a cisplatina. Em

relação àqueles que não a apresentam, depois dos diversos ciclos de tratamento com a droga muitos acabam adquirindo essa resistência por pelo menos três razões: redução na captação celular do fármaco (ou efluxo do mesmo); aumento da tolerância do organismo aos seus efeitos e desativação da cisplatina devido a sua interação com outras moléculas do organismo. Outro grande ponto negativo está relacionado com os efeitos colaterais que surgem em função da dosagem utilizada. Pacientes tratados com cisplatina mostram sinais severos de nefrotoxicidade (lesão renal), neurotoxicidade (danos no sistema nervoso) e ototoxicidade (perda auditiva). Outros efeitos colaterais registrados incluem pressão arterial elevada, diarreia, náuseas e vômitos [5].

Esses são alguns dos motivos que incentivam a busca por novos medicamentos mais eficazes e menos tóxicos, surgindo assim um novo campo de interesse na área de pesquisa da quimioterapia. 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.

Nessa busca por novos complexos de coordenação semelhantes à cisplatina, uma das maneiras de se tentar diminuir os efeitos colaterais existentes é a utilização de ligantes menos danosos ao organismo. Seguindo essa linha de raciocínio, muitos complexos foram desenvolvidos, como por exemplo, a carboplatina (Figura 3), droga da segunda geração de compostos de platina que, apesar de apresentar atividade antitumoral menor que a da cisplatina, mostra menor nefrotoxicidade e neurotoxicidade em função da presença do grupamento orgânico em sua estrutura. Esta droga foi aprovada para uso clínico em 1989, assim como outras passam atualmente por testes para serem aprovadas, como a picoplatina, oxaliplatina e a satraplatina (Figura 3).

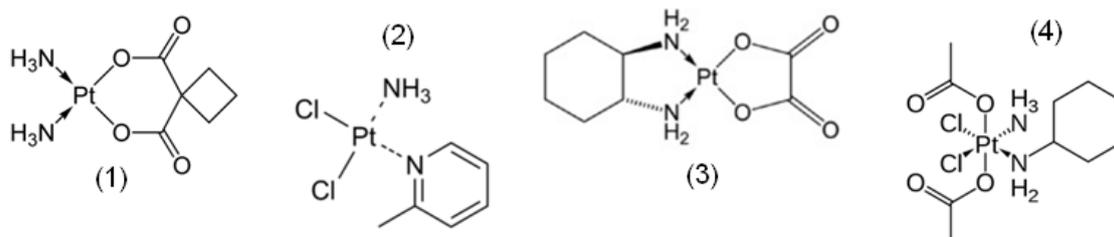


Figura 3. Outros compostos que apresentam atividade citotóxica usados na clínica, como carboplatina (1), ou em processo de testes, como a picoplatina (2), a oxaliplatina (3) e a satraplatina (4).

Na busca de novos ligantes para a síntese de novos compostos de coordenação de platina(II), foi escolhido para este trabalho um fármaco com um interessante potencial biológico, amplamente conhecido por sua utilização no tratamento da tuberculose. A pirazinamida (PZA,  $C_5H_5ON_3$ , Figura 4) sintetizada originalmente em 1936, porém somente introduzida na clínica a partir de 1970 [6], é um dos primeiros fármacos usados no tratamento da tuberculose. Sua atuação é tão marcante contra a doença que, quando usada por um período de dois meses, permite a redução no tempo de tratamento total da tuberculose de nove para seis meses [7]. Por apresentar, em sua estrutura, diferentes possíveis sítios de coordenação (nitrogênios aromáticos, oxigênio de amida), ela torna-se especialmente atraente quando se trata da Química de Coordenação, pois pode-se ligar de diferentes maneiras aos íons metálicos, além de ser um composto já liberado para uso clínico e, assim, é comprovado que este não apresenta grandes efeitos

colaterais indesejáveis quando se encontra dentro do organismo humano, esperando-se que essa característica se repita no complexo.

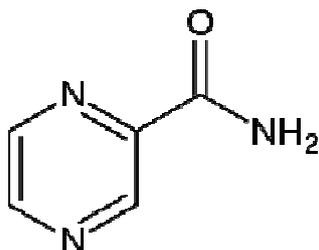


Figura 4. Fórmula estrutural do agente antituberculose pirazinamida.

Este trabalho é continuação do projeto iniciado em 2009, que teve alguns dos seus resultados apresentados no XVIII Seminário de Iniciação Científica da PUC-Rio, na XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, no XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry e no XIII Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting e visa apresentar os novos resultados obtidos até o momento.

## 2- Objetivos

Síntese e caracterização de novos compostos de platina(II) de PZA, levando em consideração que a conjugação dos potenciais biológicos de ambos pode constituir uma estratégia interessante na procura por novos antineoplásicos. Avaliação do potencial antitumoral dos mesmos, identificando possíveis espécies ativas.

## 3- Parte Experimental

### 3.1- Sínteses

#### 3.1.1- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(PZA)<sub>2</sub>] $\cdot$ 1½H<sub>2</sub>O (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 dissolvendo-se 0,25 mmol de tetracloroplatinato(II) de potássio (estequiometria 2:1) 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 24 h, e o precipitado amarelo (Figura 5) formado foi separado por filtração a vácuo, lavado com pequenas porções de água e éter 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 <sup>1</sup>H (em solução) e de <sup>13</sup>C (estado sólido). Foram realizados testes citotóxicos em linhagem de células tumorais humanas e estudos de modelagem computacional.

#### 3.1.1- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(DMSO)(PZA)] (2)

O segundo composto inédito obtido, de coloração amarela mais intensa, é derivado do composto (2) e se origina da substituição, na esfera de coordenação da platina, de um dos ligantes PZA por uma molécula de DMSO, quando (1) é dissolvido neste solvente. O precipitado formado nessa solução foi filtrado a vácuo, lavado com pequenas alíquotas de água e secado no vácuo.

A caracterização desse complexo, identificado ao longo deste relatório como complexo (2), foi efetuada através de análise elementar (CHN) e espectroscopia na região do infravermelho (IV). Também foram feitos estudos da cinética de formação do composto (2) por RMN de  $^1\text{H}$ , a 25 °C, em  $\text{DMSO-}d_6$ . Processo este também estudado através da utilização de cálculos teóricos por modelagem computacional.

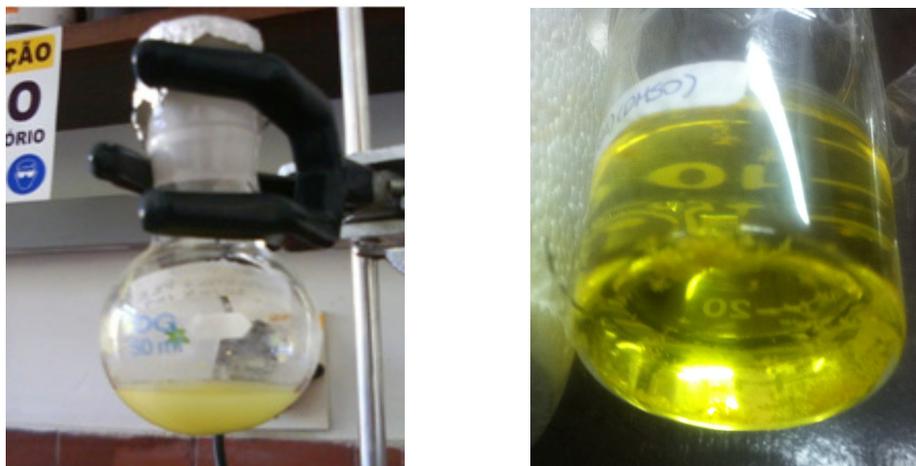


Figura 5. Síntese dos complexos inéditos (1), à esquerda, e (2), direita.

### 3.2- Caracterizações e Análises

#### 3.2.1- Análise Elementar (CHN)

Aquantificação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada em um Analisador Elementar (CHNS-O), modelo EA 1110, da CEInstruments. 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 os 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  $^1\text{H}$  (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*<sub>6</sub>, 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  $\pm 0,1$  °C.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  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 restri o 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 combina o parametrizada do funcional de intercâmbio de Beck e o funcional de correla o de Lee, Yang e Parr). Assim, o nível de teoria usado neste trabalho foi B3LYP/6-311+G(2d,p)/LANL2DZ. As frequências harm nicas de vibra o 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 colabora o 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 cole o do BCRJ). Elas foram retiradas por efusão pleural de uma mulher de 53 anos com leucemia mielóide cr nica em crise terminal blástica. A linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (CULTLAB, São Paulo) a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> umidificada a 5%. As culturas celulares crescem de forma exponencialmente de 10<sup>5</sup> células/mL para cerca de 10<sup>6</sup> células/mL em 3 dias. A viabilidade celular foi checada por exclusão com azul de Trypan. Para a avalia o da citotoxicidade, 1 x 10<sup>5</sup> células/mL foram cultivadas por 72 h na ausência e na presença de diferentes concentra es do composto de platina. A atividade do composto (**1**) foi avaliada pela concentra o que inibe o crescimento celular em 50%, IC<sub>50</sub>, assim como a realiza o de um teste que avaliava a quantidade acumulada do composto (**1**) dentro na célula. Uma soluço estoque do composto (**1**) foi preparada em DMSO (dimetilsulfóxido). A concentra o

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 dois complexos inéditos diferentes: um sólido de coloração amarelo-pálida (**1**), o qual foi completamente caracterizado pelas técnicas acima descritas, e o complexo (**2**), isolado de uma solução do complexo (**1**) dissolvido em DMSO, que em sua estrutura troca uma das moléculas do ligante PZA por uma molécula do solvente. A composição desse composto também foi determinada através dos resultados obtidos por análise elementar de CHN e espectroscopia na região do infravermelho.

Feitas as caracterizações estruturais de ambos os compostos, estudos de modelagem computacional com o composto (**1**) foram feitos em seguida, que forneceram outras informações interessantes sobre a sua estrutura de coordenação. Ainda com esse composto, também foram realizados testes para avaliar seu potencial citotóxico, fazendo testes que avaliaram o seu grau de acumulação dentro de células tumorais. Em relação ao complexo (**2**), um estudo da cinética de transição do composto (**1**) em (**2**) por RMN de  $^1\text{H}$  também foi realizado. Outros estudos de cálculos teóricos por modelagem computacional também calcularam dados referentes ao estado de transição entre esses dois complexos.

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:  $[\text{PtCl}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_3)_2] \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ . A análise elementar propõe que a fórmula molecular do composto (**2**) seja  $[\text{PtCl}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_3)(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})]$ . 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. O fato dos valores obtidos para as porcentagens experimentais e teóricas estarem em excelente concordância indica que a proposta estrutural é adequada.

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

Complexos	%C		%N		%H	
$[\text{PtCl}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_3)_2] \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ( <b>1</b> )	22,1	(22,3)	15,0	(15,6)	2,5	(2,4)
$[\text{PtCl}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_3)(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})]$ ( <b>2</b> )	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 platina elementar. A porcentagem de platina 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)

As bandas do espectro vibracional (IV) do ligante livre pirazinamida já foram atribuídas na literatura, assim como as bandas do solvente DMSO [8, 9]. 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 ( $\text{cm}^{-1}$ ) 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)
$\nu$ (O-H)	-	-	3547	-
$\nu_{\text{ass}}\text{NH}_2$	3414	-	**	**
$\nu_{\text{sim}}\text{NH}_2$	3290	-	3294	**
$\nu_{\text{ass}}(\text{C-H})$	-	3000	-	2999
$\nu_{\text{sim}}(\text{C-H})$	-	2918	-	2914
$\nu(\text{C=O})$	1714	-	1677	1654
$\nu_{\text{ring}}$	1524	-	1525	1525
$\nu_{\text{ring}}$	1478	-	1469	1478
$\nu_{\text{ring}}$	1438	-	1434	**
$\nu(\text{S=O})$	-	1055	-	1124
$\nu_{\text{ass}}(\text{C-S})$	-	690	-	700
$\nu_{\text{sim}}(\text{C-S})$	-	661	-	665
$\nu$ (Pt-S)	-	-	-	447
$\nu$ (Pt-O)	-	-	403	409
$\nu$ (Pt-Cl)	-	-	335	329
$\nu$ (Pt-Cl <sub>2</sub> )	-	-	325	315

Como pode ser visto acima, o espectro vibracional (IV) do ligante PZA livre possui bandas de interesse em 3414 ( $\nu_{\text{ass}}\text{NH}_2$ ), 3290 ( $\nu_{\text{sim}}\text{NH}_2$ ), 1714 ( $\nu\text{C=O}$ ) e três absorções em 1524, 1478 e 1438  $\text{cm}^{-1}$ , características de deformações axiais  $\nu\text{C=C}$  e  $\nu\text{C=N}$  do anel aromático. No espectro do complexo (1), a banda referente à deformação axial  $\text{C=O}$  é fortemente deslocada para uma região de menores frequências (1677  $\text{cm}^{-1}$ ), 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  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{O-H}$ ). Na região de baixas frequências ( $< 700\text{ cm}^{-1}$ ), o aparecimento de bandas de deformação axial platina-oxigênio confirma a formação do

complexo:  $403\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{Pt-O}}$ ). A presença de duas absorções para o modo vibracional  $\nu_{\text{Pt-Cl}}$ , em  $335$  e  $325\text{ cm}^{-1}$ , 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  $3000$  ( $\nu_{\text{assC-H}}$ ),  $2918$  ( $\nu_{\text{simC-H}}$ ),  $1055$  ( $\nu_{\text{S=O}}$ ),  $690$  ( $\nu_{\text{assC-S}}$ ) e  $661$  ( $\nu_{\text{simC-S}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . 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 [10]. Pode-se ver que isso ocorre no composto (2), em que a frequência de deformação axial do ligante livre, localizada originalmente em  $1055\text{ cm}^{-1}$ , desloca-se para uma frequência de vibração maior em  $1124\text{ cm}^{-1}$ . A confirmação do envolvimento do enxofre no processo de coordenação se dá pelo surgimento de uma banda na região de baixas frequências em  $447\text{ cm}^{-1}$ , 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  $1654\text{ cm}^{-1}$ , comumente atribuída na literatura a uma deformação axial C=O. Outras indicações são as bandas em  $1525$  e  $1478\text{ cm}^{-1}$ , 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  $409\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída à deformação axial  $\nu_{\text{Pt-O}}$  (presente, como visto anteriormente, em  $403\text{ cm}^{-1}$  no composto (1)).

A presença de duas absorções para o modo vibracional  $\nu(\text{Pt-Cl})$ , observadas em  $329$  e  $315\text{ cm}^{-1}$ , 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:

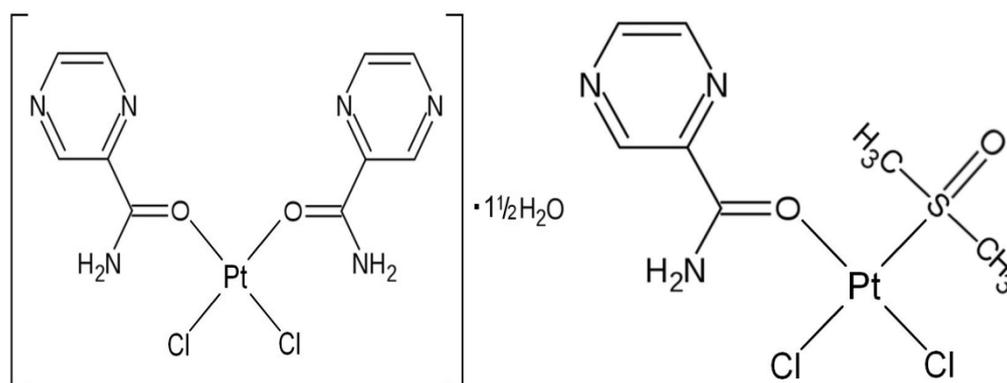


Figura 6. Fórmulas estruturais propostas para os complexos *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>ON<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]·1/2H<sub>2</sub>O (esquerda) e *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>ON<sub>3</sub>)(C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS)] (direita).

#### 4.4- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise do RMN, assim como com os resultados do IV, é feita comparando-se as absorções obtidas para o ligante livre com aquelas 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:  $^1\text{H}$ , em solução de DMSO,  $^{13}\text{C}$ , no estado sólido e por último uma análise usando  $^{195}\text{Pt}$ . Pelas técnicas de RMN, também foi realizado um estudo cinético que gerou informações a transformação do complexo (1) em (2). As análises feitas remetem apenas ao composto (1).

Para o experimento usando o núcleo de  $^{195}\text{Pt}$ , foi registrado um singlete indicado por um deslocamento químico registrado em -3343,7 ppm.

### Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ em Solução

Nesta análise, obtiveram-se informações referentes aos núcleos de hidrogênio do PZA livre e do complexo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_3)_2] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ . 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 7).

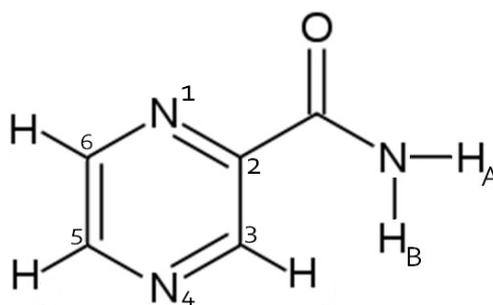


Figura 7. Representação da identificação feita para os hidrogênios da molécula do PZA.

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

Tabela 3. Informações obtidas pela análise de RMN de  $^1\text{H}$  do PZA e do composto (1)

H	$\delta$	Multiplicidade	J (Hz)	Integração	Deslocamento (ppm)					
A,B	7,79	s	-	2	-	Ligante				
	8,26				-					
	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	-	-	2	0,28	Composto (1)				
	8,4				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, a qual é bastante conjugada, e desta maneira, 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. 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 para a ligação carbono-nitrogênio.

O pequeno deslocamento no sinal do hidrogênio H<sub>5</sub> (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 H<sub>5</sub>. 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 (H<sub>3</sub>), conseqüentemente mais perto do oxigênio carbonílico, 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 complexação, o que é um indicativo do não-envolvimento do nitrogênio de amida na coordenação ao metal.

### Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C no Estado Sólido

Para o RMN de <sup>13</sup>C no estado sólido também podem ser aplicados os conceitos teóricos relacionados com os efeitos de blindagem acima discutidos.

Através do RMN de <sup>13</sup>C 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 os núcleos de carbono-13 no ligante livre e no composto (**1**)

PZA	Composto ( <b>1</b> )	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 <sup>13</sup>C 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 no valor numérico 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 retro doação 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, indicando a coordenação através do oxigênio carbonílico.

### Acompanhamento Cinético da Transição do Complexo (1) em (2)

Para dar suporte a teoria de que, quando em solução de DMSO, o complexo (1) troca um dos seus ligantes PZA por uma molécula do solvente, dando então origem ao composto (2), um estudo cinético foi realizado a partir dos dados obtidos pelos sinais de RMN do complexo (1). Usando os sinais emitidos pelos núcleos de  $^1\text{H}$  de uma solução do complexo (1) de DMSO- $d_6$  em função do tempo acompanhou-se a variação de sinais específicos do complexo e do ligante livre, foi possível comprovar essa proposição.

Primeiramente, o estudo cinético foi realizado medindo os sinais de uma solução do complexo (1) em DMSO- $d_6$  após meia e trinta e seis horas depois de seu preparo. O uso de DMSO- $d_6$  (deuterado) é importante para evitar o comprometimento nos sinais emitidos do PZA e do complexo (1), por sinais específicos do solvente. Feitas as medições mencionadas anteriormente, um novo estudo foi realizado, com uma nova solução, neste caso em um intervalo de tempo total de quatro horas em que os espectros de RMN foram registrados de 15 em 15 minutos, observando-se possíveis variações nos sinais emitidos pelos componentes da solução. Os resultados obtidos neste último estudo estão registrados abaixo (Figura 8), em que pode-se perceber o decaimento do sinal do dubleto emitido pelo núcleo previamente indicado como  $\text{H}_3$  (em 9,08 ppm) do complexo (1), assim como o aumento do singleto referente aos núcleos de hidrogênio A e B da amida do ligante livre, os quais neste caso foram registrados em 7,80 ppm. Isto mostra que, com o tempo, a concentração de PZA livre vai aumentando na solução enquanto a concentração de PZA ligado à platina vai diminuindo.

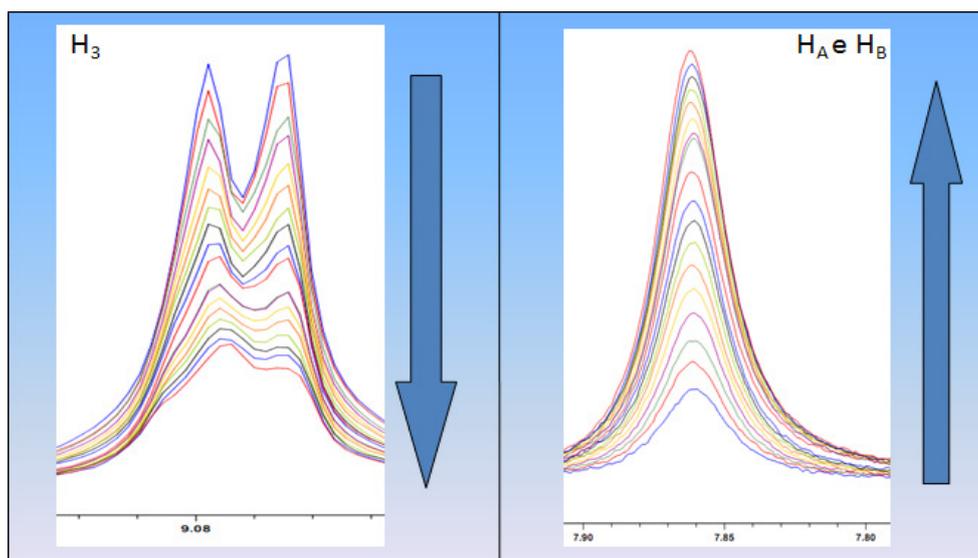


Figura 8. Gráficos indicando o decaimento de um dos sinais do complexo (1) e o aumento do sinal de um dos hidrogênios do ligante livre.

Unindo os dados referentes à redução dos sinais do complexo (1) registrados ao longo do intervalo de quatro horas com a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  gerado nos tempos de 0,5 e 36 horas depois do preparo da solução (Figura 9), pode-se claramente observar a substituição do PZA pelo DMSO na esfera de coordenação da platina(II). O desaparecimento de todos os sinais referentes ao complexo (1) no tempo de trinta e seis horas indica que essa espécie é totalmente consumida no processo, gerando as formas monossubstituída (2) e a forma dissustituída, esta última silenciosa no RMN. Uma série de pequenos sinais, não assinalados no espectro, referem-se provavelmente aos  $\text{H}'\text{s}$  de (2), espécie cuja concentração parece não variar muito ao longo do tempo e que ainda está presente após 36 horas de reação. Assim, (2) possivelmente seja uma espécie

mais importante do que **(1)** no que diz respeito à potencialidade biológica em solução de DMSO, uma vez que **(1)** não sobrevive muito tempo nessas condições.

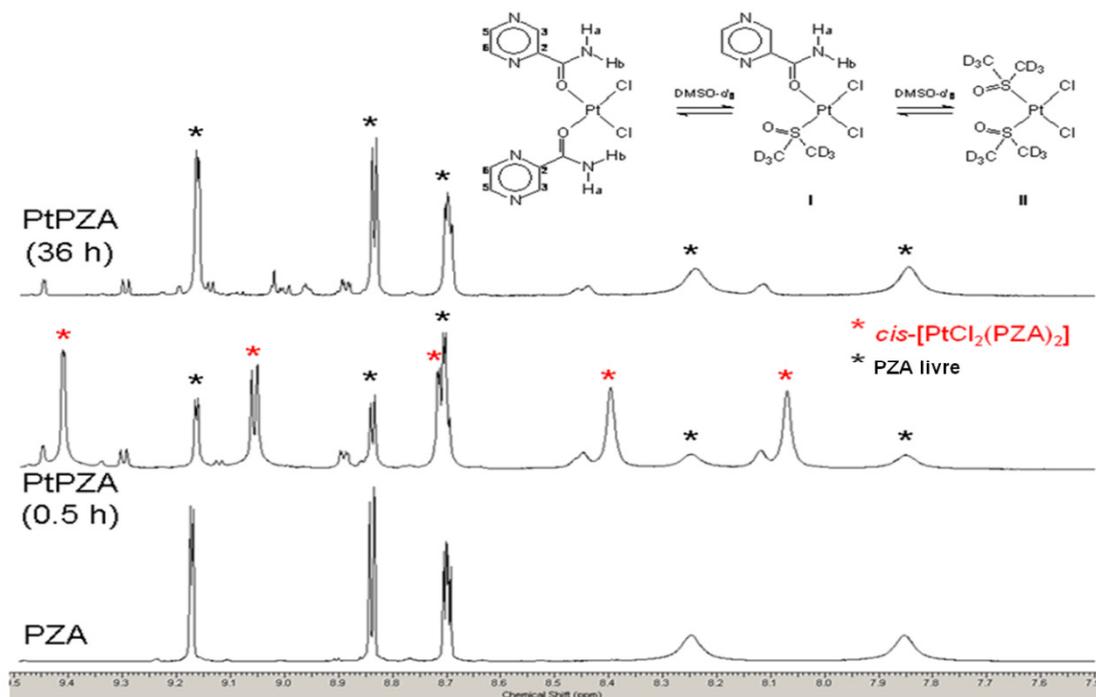


Figura 9. Representação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos, após meia hora e trinta e seis horas da preparação de uma solução do complexo **(1)** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

#### 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 e conformações mais estáveis 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. Também determinou-se o estado de transição referente a troca de uma das moléculas do PZA por uma molécula de DMSO na esfera de coordenação da platina, sendo possível determinar o mecanismo de transição do complexo **(1)** em **(2)**. A fim de facilitar a análise, cada elemento do complexo também foi identificado por um número.

#### Modelagem Estrutural dos Confôrmeros de **(1)**

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 10). 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.

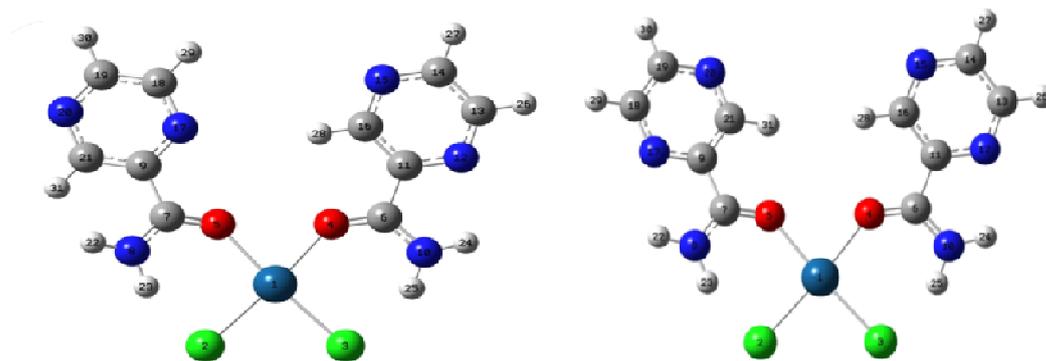


Figura 10. Estruturas calculadas para os conformeros A e B, respectivamente, de (1) em fase gás.

Como pode ser visto nas figuras acima, o conformero B apresenta maior simetria em sua estrutura e esse fato vai influenciar no comprimento das ligações (Tabela 5). Percebe-se que o conformero 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 conformero B apresenta valores iguais nas duas ligações (2,341 ppm), enquanto que no conformero A, essas ligações apresentam valores diferentes.

Tabela 4. Valores calculados para o comprimento de algumas ligações (em Å) para os dois possíveis conformeros

Conformero (A)		Conformero (B)	
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

O conformero B, mais simétrico, é cerca de 7,15 kcal/mol mais estável que o conformero A na fase gás.

### Comparação entre Dados Teóricos e Experimentais

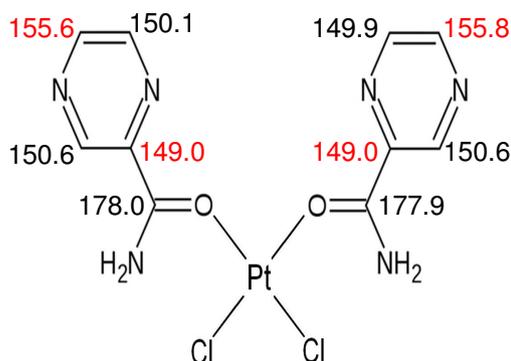
O espectro vibracional teórico também foi calculado, mas apenas para o conformero mais estável, assim como o espectro teórico do ligante livre na fase gás. Esses resultados teóricos podem ser comparados com aqueles obtidos pela espectroscopia de infravermelho. Na tabela abaixo (Tabela 5) pode-se perceber 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 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 certamente influencia em sua frequência de vibração.

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

$\nu(\text{C}=\text{O})$	PZA	Complexo (1)	Deslocamento
Teórico	1717	1673	44
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 (44 vs. 37  $\text{cm}^{-1}$ ), confirmando assim a proposta de coordenação.

Além dos cálculos realizados para a espectroscopia de infravermelho, também foram calculados os sinais de  $^{13}\text{C}$  de RMN para o complexo (1) em solução de DMSO. A ideia inicial era comparar esses dados teóricos com os dados experimentais para (1) também em solução de DMSO, mas devido a problemas de solubilidade do complexo, não foi possível a realização dessa análise. Por outro lado, a comparação dos sinais teóricos com aqueles obtidos experimentalmente para os núcleos de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido também é válida, e dela podemos tirar conclusões interessantes relacionadas a interação das moléculas do complexo com a solução a sua volta. Na figura e tabela que seguem abaixo estão registrados os sinais experimentais e teóricos obtidos.

Figura 11. Sinais de  $^{13}\text{C}$  calculados para o complexo (A) em solução de DMSOTabela 6. Comparação entre os deslocamentos químicos teóricos e experimentais obtidos para  $^{13}\text{C}$  no complexo (A)

Teórico	Exp.	Referente ao
178,0	165,3	C=O
152,3	153,9	C2 / C5
150,3	147,1	C3 / C6

Pelos dados da tabela 6, pode-se perceber que os valores registrados são a média dos sinais obtidos pelos dois anéis. Comparando os sinais teóricos e experimentais para os carbonos do anel pirazínico, percebe-se que estes foram semelhantes, não apresentando grandes disparidades entre os valores obtidos. A maior diferença observada concentra-se no carbono carbonílico, em que o sinal teórico obtido foi 178 ppm enquanto que o experimental foi 165,3 ppm. Como as análises foram realizadas em ambientes químicos diferentes acredita-se que esta seja a maior responsável pela disparidade entre os sinais. Quando em solução, a possibilidade de se realizar interações com moléculas vizinhas é muito grande, interações que podem facilmente retirar densidade eletrônica, por exemplo, do núcleo de carbono carbonílico levando a sua desblindagem e aumento do sinal registrado. No estado sólido, a estrutura mais rígida e compacta em que se encontram os compostos, pode impedir essas interações e, portanto o núcleo em questão se encontraria mais blindado pela densidade eletrônica à sua volta, caracterizado por um sinal menor, da mesma forma como foi registrado no experimento.

### Determinação Teórica do Estado de Transição entre (1) e (2)

Um excelente método de simulação de mecanismos de reação (bem como outros fenômenos químicos) quando se utiliza programas da mecânica quântica envolve cálculos usando o método Intrínseco de Reação de Coordenação (IRC - Intrinsic Reaction Coordinate). Através de cálculos usando este método foi possível determinar o estado de transição que caracteriza a transformação do complexo (1) em (2), mostrando o possível mecanismo de transição responsável pela troca dos ligantes (Figura 12).

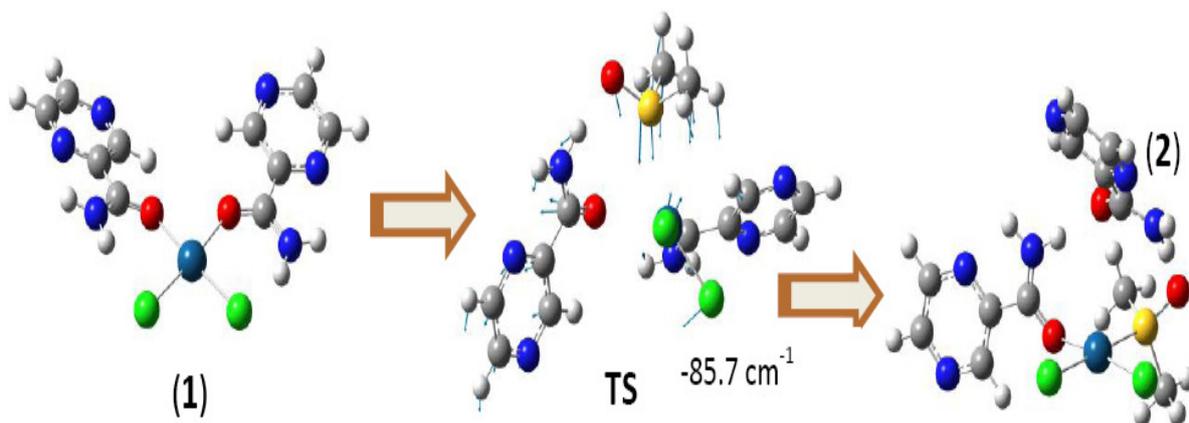


Figura 12. Estruturas otimizadas das espécies relacionadas ao complexo (1) e o processo de transição entre elas.

A figura acima mostra a aproximação da molécula de DMSO ao complexo (1) e na sequência a troca dos ligantes na esfera de coordenação da platina(II). Os cálculos realizados indicam um mecanismo associativo típico, em que a molécula de DMSO se liga a platina e em seguida ocorre a saída de uma molécula do ligante PZA. Os cálculos também indicaram que durante o estado de transição o composto apresenta uma estrutura semelhante à geometria piramidal quadrada, diferente daquela apresentada pelo composto (1) que inicialmente era quadrada planar.

### 4.6- Citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade em células tumorais são o primeiro passo para analisar a possibilidade dos compostos obtidos possuírem atividade antitumoral. Neste trabalho foram realizados dois ensaios diferentes para avaliar o potencial antitumoral dos compostos. O primeiro indicava qual era a quantidade necessária do composto para inibir o crescimento do número de células tumorais, especialmente àquela necessária para inibir 50% de crescimento celular, conhecida como  $IC_{50}$ . O segundo teste realizado indicava a quantidade de composto que era acumulada dentro da célula tumoral nas condições da  $IC_{50}$ . Os ensaios foram realizados usando células tumorais humanas da linhagem K562, linhagem derivada da leucemia, que é um câncer relacionado os glóbulos brancos do sangue.

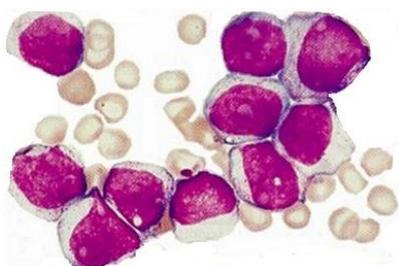


Figura 13. Células tumorais humanas da linhagem K562 vistas ao microscópio.

### Ensaio de determinação da IC<sub>50</sub>.

A determinação da IC<sub>50</sub> funciona como um indicador da citotoxicidade do composto. Quanto menor for a concentração registrada, maior pode ser considerada a atividade do composto, tendo em vista que esse fato indica que precisa-se de pouca quantidade do determinado composto para inibir o crescimento celular.

Os estudos de citotoxicidade realizados nas células tumorais indicam que o composto (1) consegue inibir o crescimento das células tumorais de maneira dependente da concentração (Figura 14). A quantidade necessária para inibir 50% do crescimento celular foi de 6,46  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , indicando uma ótima atividade citotóxica do composto (1), tendo como base o mesmo indicador para a cisplatina, composto de notável e conhecida atividade citotóxica que apresenta IC<sub>50</sub> = 2,28  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [11].

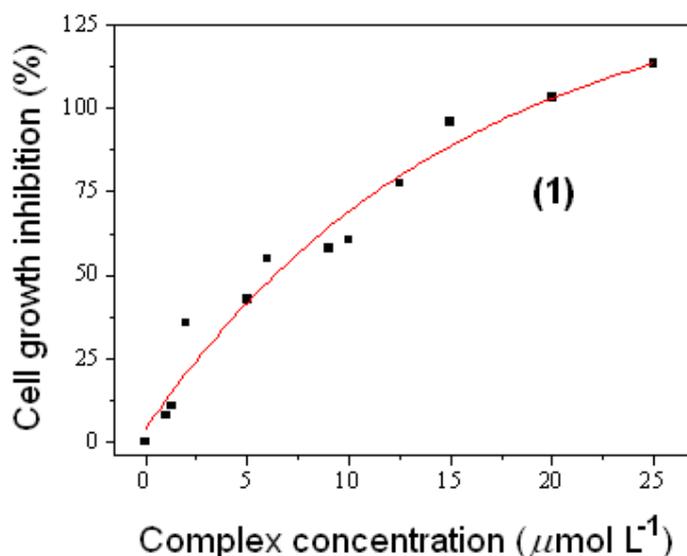


Figura 14. Inibição do crescimento celular em função da concentração molar de (1).

### Ensaio de Acumulação Celular na IC<sub>50</sub>

Este ensaio indica, baseado na concentração inicial que foi utilizada para inibir o crescimento celular, qual é a quantidade efetiva de composto que entra na célula e é verdadeiramente responsável pela apoptose celular. A acumulação do composto dentro da célula tumoral é outro fator importantíssimo para a eficácia do composto no tratamento da doença, estando diretamente relacionada à questão do aumento da resistência natural do tumor devido a uma baixa captação do composto pela célula. Dessa forma, quanto maior for a acumulação do composto dentro da célula, melhor sua atividade e também dificultando o surgimento da resistência contra o tratamento com um determinado composto.

Novamente, o ensaio realizado indica que a acumulação do composto (1) dentro da célula é de maneira dependente da concentração (Figura 9), em que a quantidade acumulada dentro da célula para inibir 50% do crescimento celular é de  $2,4 \times 10^{-16}$  mol/célula. Para avaliar a taxa de acumulação celular do composto (1), realizou-se a comparação do mesmo parâmetro com os valores registrados para a cisplatina e a carboplatina, compostos conhecidos já liberados para uso clínico. A taxa de acumulação na IC<sub>50</sub> desses dois compostos é  $1,0 \times 10^{-16}$  mol/célula, ou seja, o ensaio mostra que o composto (1) possui uma taxa de acumulação um pouco maior do que os únicos dois compostos de platina liberados para uso clínico, sendo um resultado muito importante e gratificante para o trabalho realizado.

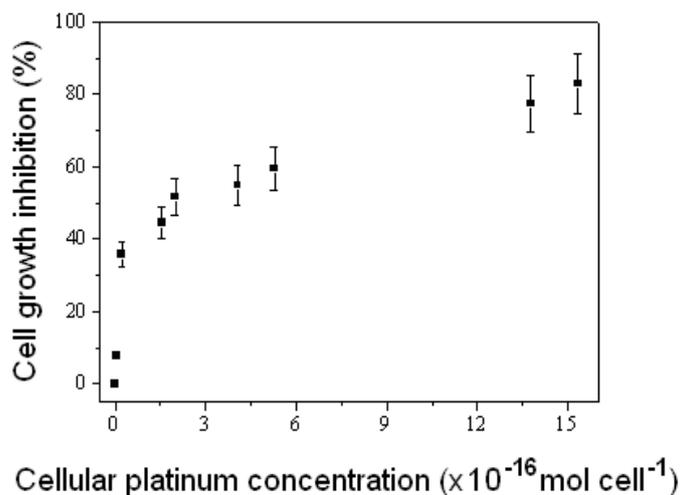


Figura 15. Inibição do crescimento celular em função da quantidade de (1) acumulada dentro da célula.

## 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*-[PtCl<sub>2</sub>(PZA)<sub>2</sub>]·1½H<sub>2</sub>O (1) e *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(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, em substituição a uma molécula de PZA, no composto (2). A RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C confirmou as estruturas propostas e também foi utilizada para estudar a cinética de transformação do composto (1) em (2), mostrando que em torno de 36 horas depois que uma solução de DMSO do composto (1) é preparada, ocorre total substituição de um dos ligantes pirazínicos, que é trocado por uma molécula do solvente. O segundo PZA é substituído apenas parcialmente.

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 B, 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 <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. As informações obtidas por esses cálculos reforçaram a estrutura molecular proposta para o composto (1). Usando o Método Intrínseco da Coordenada de Reação (IRC) foi determinado o estado de transição para a troca de uma molécula de PZA por uma de DMSO, o qual apresenta uma geometria estrutural do tipo piramidal quadrada, o que caracteriza um mecanismo de tipo associativo.

O estudo citotóxico mostra que é necessária uma concentração de 6,46 µmol/L do complexo (1) para inibir o crescimento celular em 50% (IC<sub>50</sub>) de células tumorais humanas da linhagem K562. Outro ensaio realizado indica que a quantidade de (1) acumulada dentro da célula tumoral necessária para inibir seu crescimento celular em 50% é 2,4 x 10<sup>-16</sup> mol/célula. Ambos os testes apresentaram resultados para o complexo

(1) da mesma ordem de grandeza da cisplatina, composto amplamente usado na clínica para o tratamento do câncer. Estudos complementares estão sendo realizados para que em seguida sejam realizados os testes citotóxicos com o complexo (2). Acredita-se na possibilidade de que ele seja a forma ativa de (1).

## 6- Referências

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (Último acesso em 14/06/2011)
- [2] Ana Paula Soares Fontes, Sérgio Gama de Almeida, Letícia de Andrade Nader. Compostos de Platina em Quimioterapia do Câncer. Artigo de Revisão. Química Nova, 20 (4) (1997).
- [3] [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=101](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101) (Último acesso em 14/06/2011)
- [4] Nature Reviews – Cancer. Lloyd Kelland, Volume 7 (2007)
- [5] N.J. Wheate, J.G. Collins / Coordination Chemistry Reviews 241, 133-145 (2003)
- [6] Frieden, T. R. e Driver, C. R. *Tuberculosis* 83(1-3), 82-85 (2003).
- [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] S. Akyuzet *al. Journal of Molecular Structure* 834–836 (2007) 399–402.
- [9] Cotton, F. A.; Francis, R. e Horrocks Jr, W. D. *J. Phys. Chem.*, 64, 1534 (1960).
- [10] Melanson, R. e Rochon, F. D. *Can. J. Chem.* 53, 2371 (1975).
- [11] Li, L.; Keating, M. J.; Plunkett, W. e Yang, L. *Molecular Pharmacology*, Vol. 52 (5), 798-806 (1997)

## 7- ANEXO–Comunicação dos Resultados

Este trabalho é continuação do projeto iniciado em 2009, que teve alguns dos seus resultados apresentados no XVIII Seminário de Iniciação Científica da PUC-Rio, na XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, no XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, no XIII Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting e teve resumo aceito para o XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica – SBQT 2011 a ser realizado em novembro deste ano.