



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

Trabalho de Conclusão de Curso
Bacharelado em Química

**Caracterização dos complexos de gálio
(III) e bismuto (III) de tetraciclina em
solução, e avaliação da citotoxicidade e
da interação com a ADN**

Lílian Amaral de Carvalho

Belo Horizonte
Novembro de 2010

Departamento de Química

Instituto de Ciências Exatas

Universidade Federal de Minas Gerais

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BACHARELADO EM QUÍMICA

**TÍTULO: “CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE GÁLIO(III) E
BISMUTO(III) DA TETRACICLINA EM SOLUÇÃO E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE E DA INTERAÇÃO COM O ADN”**

Aluna: LÍlian Amaral de Carvalho

Curso: Bacharelado em Química

Orientadora: Elene Cristina Pereira Maia

Departamento de Química/ ICEX

ÍNDICE:	
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	10
I - INTRODUÇÃO.....	11
II -OBJETIVOS.....	15
III - RELEVÂNCIA DA PROPOSTA DE TRABALHO.....	16
IV – TÉCNICAS MAIS UTILIZADAS.....	17
IV.1- ESPECTROFOTOMETRIA NA REIÃO DO ULTRA VIOLETA-VISÍVEL.....	17
IV.2- ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	19
V – EQUIPAMENTOS.....	26
V.1- EQUIPAMENTOS.....	26
V.2- MATERIAIS.....	27
VI – METODOLOGIA.....	28
VI.1- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	28
VI.2- CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES COMPLEXAS PRESENTES EM SOLUÇÃO.....	28
VI.3- ESTUDO DO EFEITO DOS COMPLEXOS EM CÉLULAS TUMORAIS.....	29
VI.4- ESTUDO DA INTERAÇÃO DO COMPOSTO 1 COM O ADN.....	29
VII- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
VII.1- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	30

VII.2- CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES COMPLEXAS PRESENTES EM SOLUÇÃO.....	34
VII.3- ESTUDO DO EFEITO DOS COMPLEXOS EM CÉLULAS TUMORAIS.....	48
VII.4- ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM O ADN.....	50
VIII - CONCLUSÕES.....	52
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
X- TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS E OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS.....	57

Resumo:

O presente trabalho de conclusão de curso refere-se à síntese, caracterização, estudo da citotoxicidade e das interações com o ADN de complexos inéditos de bismuto(III) e de gálio(III) da tetraciclina.

Os complexos foram caracterizados através de análises elementar e condutimétrica, espectrometrias vibracional e de massas.

Os resultados de análise elementar e de condutimetria estão de acordo com as formulações: $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{Cl})(\text{OH})]$, complexo **1**, e $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, complexo **2**. Através da espectrometria no infravermelho verificou-se que o oxigênio do grupo amida está envolvido na esfera de coordenação do metal. Os estudos por ESI-MS comprovaram a presença das espécies propostas em solução.

Os testes de citotoxicidade, realizados em células de leucemia mielóide crônica, demonstraram que os compostos são muito mais potentes do que a tetraciclina livre na inibição do crescimento de células tumorais, com valores de CI_{50} em torno de $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

As interações do complexo **1** com o ADN foram estudadas por espectrofotometria na região do UV-Vis. Os resultados mostraram a formação de um complexo ternário com uma constante de afinidade, K , igual a $3,02 \times 10^4$.

Os resultados obtidos sugerem que a atividade citotóxica esteja relacionada com a interação dos complexos com o ADN.

Abstract:

This work reports on the synthesis, characterization, study of the cytotoxicity and the interactions with DNA of new complexes of bismuth(III) and gallium(III) of tetracycline.

The complexes were characterized by elemental and conductivity analyses and vibrational and mass spectrometries.

The results of the elemental and conductimetric analyses are in accordance with the formulations: $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{Cl})(\text{OH})]$, complex 1, and $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, complex 2. By means of the infrared spectrometry, the participation of the oxygen of the amide group in the metal coordination sphere was verified. The ESI-MS studies confirmed the presence of the proposed species in solution.

The cytotoxicity assays, performed in chronic myeloid leukemia cells, showed that the compounds are much more potent than free tetracycline in inhibiting the growth of tumor cells, with CI_{50} values around $7.5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

The interactions of complex 1 with DNA were studied by UV-Vis spectrophotometry. The results showed the formation of a ternary complex with an affinity constant, K , equal to 3.02×10^4 .

These results suggest that the cytotoxic activity is related to the interaction of the complexes with the DNA.

Lista de abreviaturas e símbolos:

- Tc = Tetraciclina
- ADN = Ácido Desoxirribonucléico
- CI_{50} = concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
- Λ_M = condutividade molar
- UV = região do ultravioleta no espectro eletromagnético
- Vis = região do visível no espectro eletromagnético
- IV = infravermelho

Lista de figuras:

- Figura 1: Estrutura da tetraciclina totalmente protonada.....14
- Figura 2: Representação esquemática da fonte do “electrospray”: a- capilar, b- contra-eletrodo, c-cone de amostragem, d- skimmer, e- lentes do skimmer. A região I está à pressão atmosférica, a região II, a pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo.....20
- Figura 3: Deformação e fissão de uma gota. No estágio I, é considerado o aspecto de uma gota com excesso de carga que acabou de ser introduzida em uma região sob campo elétrico. No estágio II, observa-se que a gota começa a sofrer deformação e o excesso de carga, que estava uniformemente distribuído sobre sua superfície, agora começa a concentrar-se na direção determinada pelo campo elétrico. O estágio III mostra que, embora a maior parte do corpo da gota permaneça intacta, há uma deformação significativa da região de maior densidade de carga. Esta deformação acentua-se até o momento em ocorre a projeção das gotículas (IV), as quais devem, de fato, possuir maior densidade de carga que a gota mãe.22
- Figura 4: Espectros no infravermelho da tetraciclina (azul) e do composto 1 (preto).....31
- Figura 5: Espectros no infravermelho da tetraciclina (azul) e do composto 2 (preto).....32
- Figura 6: Estrutura proposta para o composto 1.....33
- Figura 7: Estrutura proposta para o composto 2.....34
- Figura 8: Espectros no UV-Vis do composto 1 (preto) e Tc (azul), ambos com concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão HEPES pH 7,2.....35

Figura 9: Espectro de massas, ESI-MS, no modo positivo, do composto [Bi(C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈)(Cl)(OH)].....	36
Figura 10: Possível estrutura para a espécie com m/z 705,08.....	37
Figura 11: Possível estrutura para a espécie com m/z 688,02.....	37
Figura 12: Possível estrutura para a espécie com m/z 669,02.....	38
Figura 13: Possível estrutura para a espécie com m/z 500,02.....	38
Figura 14: Possível estrutura para a espécie com m/z 507,15.....	39
Figura 15: Espectro de massas resultante da fragmentação do pico em m/z 705.....	40
Figura 16: Espectro de massas, ESI-MS, do composto 2 no modo positivo e distribuição isotópica simulada para os compostos de Bi(III) de carga 1+.....	40
Figura 17: Espectro de massas, ESI-MS, do composto 2 no modo positivo.....	41
Figura 18: Possível estrutura para a espécie com m/z 585,9	42
Figura 19: Possível estrutura para a espécie com m/z 567,94	42
Figura 20: Possível estrutura para a espécie com m/z 622,12.....	43
Figura 21: Possível estrutura para a espécie com m/z 640,82	44

Figura 22: Possível estrutura para a espécie com m/z 660,87	44
Figura 23: Possível estrutura para a espécie com m/z 734,31.....	45
Figura 24: Possível estrutura para a espécie com m/z 770,29.....	45
Figura 25: Possível estrutura para a espécie com m/z 803,95.....	46
Figura 26: Espectro de massa no modo positivo, ESI MS, e distribuição isotópica simulada para os compostos de Ga(III) de carga 1+.....	47
Figura 27: Espectro de massa no modo positivo, ESI MS, e distribuição isotópica simulada para os compostos de Ga(III) de carga 2+.....	47
Figura 28: Efeito do composto 1 no crescimento de células K562.....	48
Figura 29: Efeito do composto 2 no crescimento de células K562.....	48
Figura 30 – Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo 1 (2×10^{-5} mol L ⁻¹) e concentrações crescentes de ADN, em pH 7,4.....	50

Lista de tabelas:

Tabela 1: Dados das análises elementares e condutimétricas para os complexos **1** e **2**. Os valores entre parênteses são calculados para $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{Cl})(\text{OH})]$, complexo **1**, ou $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, complexo **2**.....30

Tabela 2: Inibição do crescimento celular da linhagem K562 pelos complexos **1** e **2**.....49

I – INTRODUÇÃO:

A palavra neoplasia, nome científico do câncer, significa “novo crescimento”. As células malignas multiplicam-se em excesso, ignorando as restrições de crescimento impostas pelas diferentes partes do organismo.

Considera-se neoplásica uma célula que adquire as seguintes características:

1. perda do controle de proliferação e da divisão celular,
2. imortalização celular,
3. presença de alteração nos cromossomos,
4. perda das propriedades adesivas da membrana plasmática,
5. perda da função e da capacidade de diferenciação ou especialização,
6. capacidade de invadir o tecido vizinho e formar metástases,
7. capacidade de induzir formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese).

No ciclo celular, o ADN (ácido desoxirribonucléico) é duplicado e a célula, dividida (mitose), originando uma nova célula. Para iniciar um ciclo, a célula em repouso é estimulada por fatores de crescimento, hormônios e citocinas (proteínas que atuam como hormônios), sendo estes produzidos por elas mesmas ou por células vizinhas. Esses fatores ligam-se aos receptores de membranas e uma série de reações químicas e eventos

morfológicos ocorrem de modo sucessivo e ordenado dentro de cada fase do ciclo de divisão celular (G1, S, G2 e mitose).

Uma importante etapa ocorre durante a transição das fases G1/S e G2/mitose. Nesses importantes momentos, conhecidos como “pontos de checagem”, a célula decide se continua o processo de divisão ou se interrompe o ciclo e inicia o processo de morte celular por apoptose. Esse mecanismo de controle de falhas e erros é essencial. Portanto, qualquer defeito em um dos componentes ou operadores desse processo poderá provocar a proliferação contínua das células, podendo gerar o câncer. [1]

Uma das aplicações mais importantes de complexos metálicos em terapia é no tratamento de câncer. A descoberta da atividade antitumoral da cis-diaminodicloroplatina(II) (cisplatina) [2] levou a um aumento da sobrevivência de pacientes acometidos por vários tipos de câncer como o testicular, ovariano e carcinoma pulmonar [2-5]. No entanto, o uso clínico de quimioterápicos a base de platina tem sido limitado pelo aparecimento de resistência aos medicamentos, além de efeitos colaterais indesejáveis, como toxicidade aos rins, náuseas, vômitos e neurotoxicidade. [6-8]. Estes obstáculos têm estimulado o desenvolvimento de novos complexos com outros íons metálicos para o tratamento do câncer [9]. Como um dos principais alvos de agentes antitumorais é o ADN, a síntese de complexos contendo ligantes e íons metálicos que conhecidamente interagem com o ADN é uma estratégia promissora.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a coordenação de platina(II) e paládio(II) à tetraciclina e doxiciclina resulta em compostos ativos contra linhagens de bactérias resistentes [10-12]. Devido ao grande potencial biotecnológico desta descoberta, foi feito um depósito de patente relativo a estes compostos, PI 0601053-9 [13]. Além disto,

estes compostos são capazes de inibir o crescimento de células tumorais em concentrações em que não são tóxicos contra macrófagos [14].

As tetraciclinas possuem a capacidade de inibir as metaloproteinases de matriz, que são membros da família das metalopeptidases dependentes de zinco e estão envolvidas nos estágios de progressão do câncer. Garcia e colaboradores sugerem que a inibição da atividade da metaloproteinase pela doxiciclina ocorra através das interações com os átomos de zinco e/ou cálcio presentes na estrutura da proteína [15].

Além da importância farmacológica das tetraciclinas, estas drogas possuem uma estrutura química muito interessante, podendo formar quelatos em várias posições da molécula devido à presença de vários grupos doadores (N,O). As tetraciclinas coordenam-se a íons metálicos presentes nos meios biológicos, sendo que a sua biodisponibilidade é afetada pela coordenação [10]. Os sítios de coordenação incluem os oxigênios em C10-C12, o oxigênio enólico em C3 e os nitrogênios em C4 e no grupo amida do anel A (Figura 1). As tetraciclinas possuem três prótons dissociáveis, um no sistema tricarbonil C1-C3 no anel A, outro no sistema ceto-fenólico em C10-C12, e outro no grupo dimetilamônio em C4, com valores de pKa 3,47, 7,66 e 9,29, respectivamente [10].

Por causa da importância biológica das tetraciclinas, suas interações com íons metálicos, principalmente cálcio e magnésio, têm sido estudadas, utilizando principalmente as técnicas de RMN, dicroísmo circular e UV-Vis. Como as estruturas das tetraciclinas são particularmente complexas, com grande número de sítios potencialmente complexantes, tem havido muita controvérsia na localização dos sítios de coordenação envolvidos [16-25].

A estrutura da tetraciclina está representada na Figura 1.

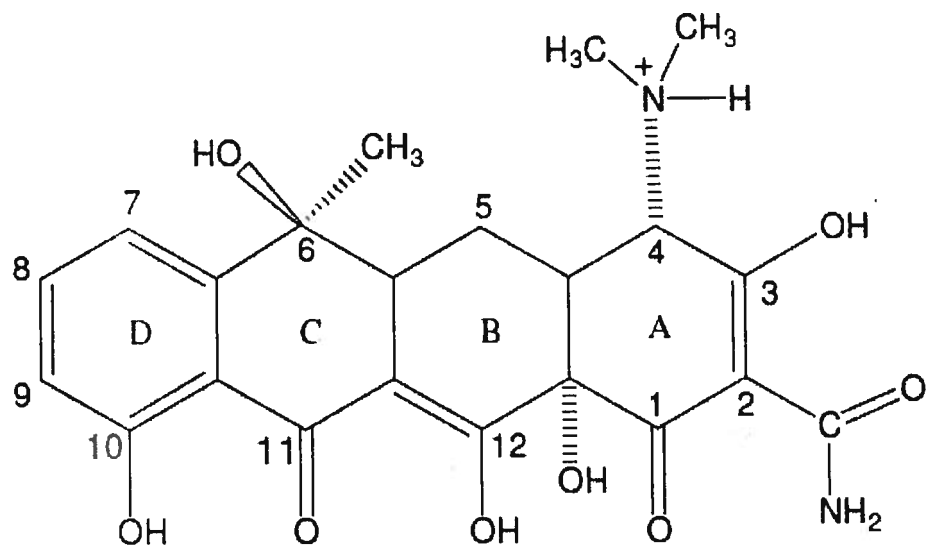


Figura 1: Estrutura da tetraciclina totalmente protonada.

Por outro lado, a atividade antitumoral de complexos de Ga(III) e Bi(III) tem sido alvo de estudos de vários grupos de pesquisa [26, 27]. Podem ser citados como exemplo complexos de bismuto com a 6-mercaptopurina, que apresentaram resultados promissores como agentes antitumorais [28]. O nitrato de gálio já é usado em estudos clínicos para o tratamento de linfomas e o maltolato de gálio também apresentou boa atividade [29].

Neste trabalho, foi feito um estudo do potencial antitumoral de novos complexos de Bi(III) e Ga(III) com tetraciclina.

II – OBJETIVOS:

O objetivo geral deste trabalho de conclusão de curso é o estudo do potencial antitumoral de novos complexos de Bi(III) e Ga(III) com tetraciclina. Os complexos a serem estudados foram previamente sintetizados e caracterizados no estado sólido: $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{Cl})(\text{OH})]$ e $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Mais especificamente, as seguintes metas são esperadas: i) identificação das espécies presentes em solução aquosa, visando à identificação da espécie predominante em condições fisiológicas; ii) avaliação da atividade citotóxica dos complexos em células tumorais e iii) avaliação da interação dos compostos com o ácido desoxirribonucléico (ADN).

III- RELEVÂNCIA DA PROPOSTA DE TRABALHO

Os antibióticos da família das tetraciclina possuem muitas vantagens com relação a outros agentes atualmente conhecidos, como amplo espectro de ação, baixa toxicidade e administração oral. Estas propriedades favoráveis das tetraciclina têm feito com que estes medicamentos voltem a figurar entre os mais promissores.

Os compostos propostos podem manter as propriedades favoráveis das tetraciclina, como o amplo espectro de ação e baixa toxicidade, e serem ativos em células tumorais.

Uma questão importante a ser considerada visando o uso de complexos metálicos em quimioterapia é a especiação em soluções aquosas diluídas, pois geralmente eles são usados em baixas concentrações. Os testes de atividade biológica são feitos dissolvendo-se os complexos em solvente apropriado. Uma vez em solução, um equilíbrio químico é estabelecido e novas espécies podem ser formadas, por exemplo, alguns ligantes podem ser trocados por moléculas de água. Portanto, é muito importante estudar a estabilidade destes complexos em soluções diluídas mimetizando-se as condições dos meios biológicos.

IV- Técnicas mais utilizadas:

IV.1- Espectrofotometria no ultravioleta-visível:

A absorção de energia na região UV-visível do espectro eletromagnético por uma molécula depende da estrutura eletrônica da mesma e resulta da excitação de elétrons do estado fundamental para estados excitados. Uma das vantagens da espectroscopia eletrônica reside na sua seletividade: grupos característicos podem ser igualmente reconhecidos em moléculas com diferentes graus de complexidade [30].

No que diz respeito ao estudo de reações químicas, o método espectrofotométrico mostra-se útil quando as mesmas são acompanhadas por mudanças apreciáveis na absorção de luz. Se as absorvidades molares forem suficientemente grandes, fica em evidência outra vantagem da espectrofotometria: a possibilidade de se utilizar concentrações bastante baixas, o que permite trabalhar com espécies (reagentes e/ou produtos) pouco solúveis e fazer estudos cinéticos de sistemas que, em concentrações mais elevadas, reagiriam muito rapidamente.

Dois parâmetros importantes são obtidos do espectro eletrônico: as posições dos picos de absorção e a intensidade das bandas. A energia característica de uma transição e o correspondente comprimento de onda da radiação absorvida são propriedades de um grupo de átomos na molécula. Portanto, a partir dos espectros eletrônicos podem-se retirar informações sobre a natureza dos grupos presentes. A intensidade das bandas relaciona-se com a concentração da substância absorvente. Conseqüentemente, medidas de absorvâncias podem ser usadas para determinar constantes de equilíbrio.

Constante de equilíbrio e sua relação com a absorvância

Quando uma radiação monocromática de intensidade I_0 incide sobre uma solução contendo uma espécie absorvente, parte da radiação é absorvida e parte, transmitida através do meio (emergindo do mesmo com uma intensidade $I < I_0$). Os aspectos quantitativos da absorção de radiação eletromagnética na região do UV-visível são regidos por uma expressão matemática empírica, conhecida como lei de Lambert-Beer:

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon.l.c$$

em que A é a absorvância, ϵ é a absortividade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l é o comprimento do caminho óptico (cm) e c , a concentração (mol L^{-1}) da espécie absorvente. De acordo com esta lei, a absortividade molar ϵ é uma constante característica da espécie absorvente para um determinado comprimento de onda e seu valor independe da potência da radiação incidente, assim como também do comprimento do caminho óptico e da concentração.

A lei de Lambert-Beer pode ser aplicada a sistemas contendo mais de uma substância absorvente, desde que não haja interação entre os seus cromóforos. Neste caso, a absorvância total num dado comprimento de onda é igual à soma das contribuições individuais de cada uma das substâncias absorventes presentes:

$$A = \epsilon_1.l.c_1 + \epsilon_2.l.c_2 + \dots + \epsilon_i.l.c_i$$

em que i é o número de espécies absorventes presentes no sistema.

Supondo-se que essas espécies absorvam luz na região do visível e/ou ultravioleta e que a lei de Lambert-Beer seja válida nas condições experimentais utilizadas, pode-se

chegar a uma relação entre constante de equilíbrio e absorvância. Medindo-se a absorvância de um sistema enquanto se varia a concentração de um dos constituintes do mesmo, é possível determinar os valores das constantes de equilíbrio das espécies formadas no meio. Para sistemas complexos, os cálculos tornam-se complicados e devem ser realizados com o auxílio de programas computacionais.

IV.2 - Espectrometria de massas:

Uma técnica analítica que está sendo muito utilizada para caracterização de complexos metálicos é a espectrometria de massas.

Um espectrômetro de massas é um instrumento capaz de separar íons de acordo com sua razão massa/carga. Existem vários modos de efetuar a separação e detecção dos íons, mas a etapa que possui maior diversidade de execução é a etapa de ionização do composto. Isso acontece, pois o número e o tipo de espécies a serem ionizadas são grandes. A ionização por “electrospray” foi sugerida como um possível modo de ionização por Dole, em 1968. Mas, somente em 1984 que Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade da fonte de “electrospray” como um método de ionização branda. Assim, o eletrospray surgiu como uma alternativa para a geração de íons de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida.

Na ionização por eletrospray, há uma transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. Nela, é formado um spray eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados íons. Normalmente, a solução é bombeada através de um capilar (50 a 100 μm de diâmetro interno) com uma vazão inferior a 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. No caso de fluxos menores que 1 $\mu\text{L min}^{-1}$, o processo é chamado de “nanoeletrospray”. Na Figura 2 é mostrada uma representação esquemática da fonte de

electrospray de um instrumento espectrômetro Platform II (Micromass, Inglaterra). Ao se aplicar, por exemplo, um potencial positivo na solução, os íons positivos tendem a ir para uma região menos positiva, o contra-eletrodo. Assim, a gota formada na ponta do capilar estará enriquecida com íons positivos. Este tipo de separação de carga é chamado de processo eletroforético. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando a deformação da gota. A gota ganha a forma de um cone que é denominado de cone de Taylor. Vai ocorrer um acúmulo de densidade positiva na gota, o que causará uma grande repulsão entre os íons. Assim, chegará um momento em que essa força de repulsão será maior que a tensão superficial, o que fará com que a gota se transforme em pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução.

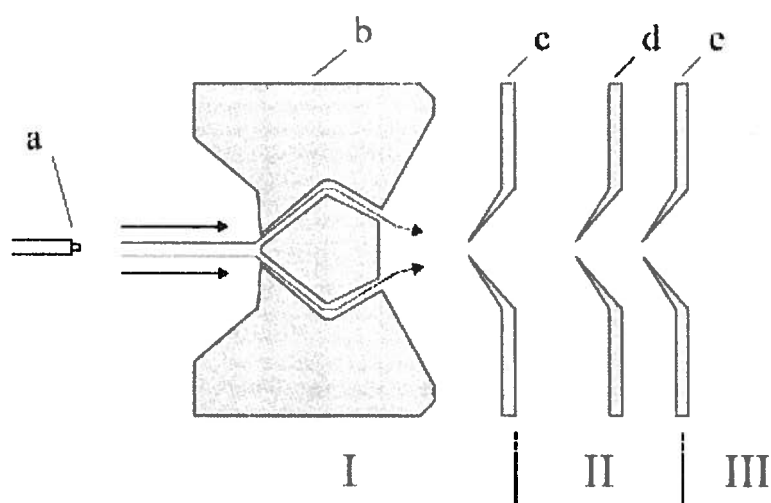


Figura 2: Representação esquemática da fonte do “electrospray”: a- capilar, b- contra-eletrodo, c-cone de amostragem, d- skimmer, e- lentes do skimmer. A região I está à pressão atmosférica, a região II, a pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo.

Após a liberação das gotas, elas seguem para a direção do contra-eletrodo. Nesse percurso, ocorre a dessolvatação das gotas. Devido à energia térmica do ambiente e ao auxílio de um gás secante, normalmente nitrogênio, a evaporação do solvente é favorecida. Com a perda gradativa do solvente, a densidade de carga vai aumentando, o que gerará um aumento da repulsão, até o ponto desse aumento de repulsão vencer a tensão superficial. Com isso, a gota é dividida em pequenas gotículas.

A carga máxima Q que uma gota de raio R pode manter antes de se fragmentar é fornecida pela Equação 1.

$$Q = 8\pi \cdot (\epsilon_0 \cdot \gamma \cdot R^3)^{1/2} \quad (1)$$

onde ϵ_0 é a permissividade livre no espaço e γ é a tensão superficial da gota.

Esta equação foi proposta por Lord Rayleigh em 1882 e é comumente conhecida como o limite de Rayleigh.

Esse processo vem sendo estudado por vários grupos de pesquisa. Taflin e colaboradores demonstraram que, na verdade, a gota é dividida antes do limite de Rayleigh, a aproximadamente 80% desse limite. Isso ocorre por dois motivos: primeiramente, porque a gota vibra, o que favorece sua fissão. O outro motivo é o fato da gota possuir desequilíbrio de cargas, o que causará uma deformação, devido ao fato dela estar imersa em intenso campo elétrico. A Figura 3 mostra como ocorre essa deformação.

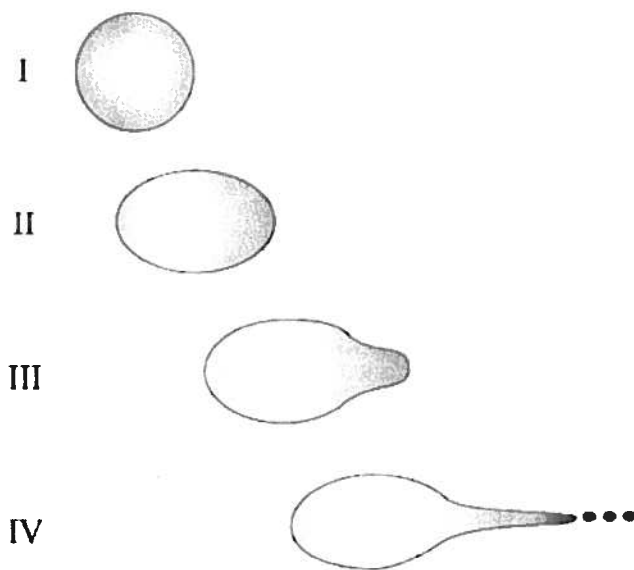


Figura 3: Deformação e fissão de uma gota. No estágio I, é considerado o aspecto de uma gota com excesso de carga que acabou de ser introduzida em uma região sob campo elétrico. No estágio II, observa-se que a gota começa a sofrer deformação e o excesso de carga, que estava uniformemente distribuído sobre sua superfície, agora começa a concentrar-se na direção determinada pelo campo elétrico. O estágio III mostra que, embora a maior parte do corpo da gota permaneça intacta, há uma deformação significativa da região de maior densidade de carga. Esta deformação acentua-se até o momento em ocorre a projeção das gotículas (IV), as quais devem, de fato, possuir maior densidade de carga que a gota mãe.

Esse processo é bem entendido até a gota chegar ao raio de 30nm. Após essa etapa, não se sabe ao certo o que ocorre e como o íon é formado na fase gasosa. Há dúvidas se o íon é expelido da gota ou se a gota se divide até restar um único íon. Dois mecanismos foram propostos para explicar a formação do íon em fase gasosa. O primeiro foi proposto por Dolen em 1986 e sugere que haverá a formação de uma gotícula muito pequena, com

raio próximo a 1 nm, e que nela haverá apenas um íon. A perda do solvente resultará em um íon na fase gasosa. Essa proposta foi nominada modelo da carga residual (CRM). O segundo foi proposto por Thomson e Iribarne e sugere que os íons irão ser emitidos de uma gotícula pequena altamente carregada com vários íons. Esse processo ocorrerá quando o raio da gota for de aproximadamente 8 nm e ela contiver 70 cargas, aproximadamente. A gota não sofrerá ruptura. Essa proposta ficou conhecida como modelo da evaporação do íon (IEM).

O IEM foi proposto porque em um espectro de soluções de NaCl 1 mmol L⁻¹, em metanol/água, o único íon detectado foi o Na⁺. Espécies como Na_n(NaCl)ⁿ⁺¹_m, que deveriam ser formadas caso o modelo CRM ocorresse, não foram observadas. Mas, em um experimento feito por Wang e Cole, mostraram a existência de íons Cs⁺ e Cs(CsCl)⁺ em uma solução 50% metanol/água. Com isso, ainda é provável que ambos os modelos ocorram simultaneamente.

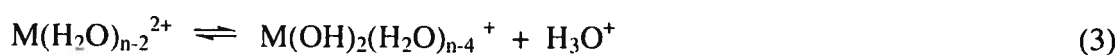
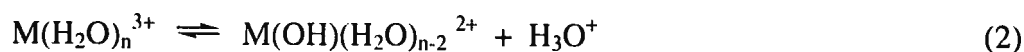
Após ser formado, o íon alcança a região do capilar ou cone de amostragem. A partir daí, o sistema passa por uma região de baixa pressão. Na entrada, há um conjunto de lentes que leva o íon ao analisador de massas (Figura 2). Essa região, entre o capilar e as lentes, é muito importante, pois nela pode ocorrer dissociação induzida por colisão (CID). Essa dissociação ocorre quando os íons formados colidem com o gás secante (nitrogênio). Assim, um íon solvatado pode perder a molécula de solvente ou sofrer processos de rearranjo intramolecular ou fragmentações, por exemplo.

Um dos problemas do eletrospray é a falta de linearidade entre a concentração e a intensidade. Fatores como a vazão da amostra, do gás nebulizante, do gás secante e a distância da ponta do capilar ao eletrodo afetam a estabilidade do eletrospray e, portanto, a formação dos íons em fase gasosa. Mas, esses fatores são facilmente controláveis. Mas,

existe um fator que não se pode controlar e que afetam essa linearidade, presença de outros eletrólitos, impurezas. As impurezas competirão com os íons de interesse na passagem dos íons para a fase gasosa. Se os íons de interesse estiverem em baixas concentrações, as impurezas serão levadas para a fase gasosa em maior número. Ou seja, a intensidade dos íons não depende apenas da concentração dele na solução, mas da concentração de todos os outros íons também. A faixa de linearidade do eletrospray esta entre 10^{-6} a 10^{-3} mol L⁻¹. Um solvente amplamente utilizado, o metanol, possui impurezas, como sais de amônio e sódio, com concentrações próximas a 10^{-5} mol L⁻¹.

Durante todos os processos que ocorrem no ESI-MS, pode haver a formação de outras espécies e rearranjos, como já foi dito. Outro processo que causa a formação de novas espécies, além do CID, é durante o processo de dessolvatação da gota. Nele a concentração das espécies e o pH da gota são consideravelmente afetados devido a perda do solvente. Como o grau de ionização das espécies depende do pH, a sua mudança irá afetar o espectro de massas obtido.

Outro processo que pode também pode ocorrer devido à dessolvatação da gota é a redução da carga do composto formado em solução. Ao diminuir a esfera de solvatação do composto, devido à perda do solvente, ele não consegue mais se estabilizar e acaba gerando outras espécies não encontradas na solução original. A incorporação de íons de carga negativa, como OH⁻, se estiver no modo positivo, ou incorporação de íons de carga positiva, caso o esteja no modo negativo. As equações 2 e 3 mostra um exemplo que pode ocorrer.



As principais aplicações da ionização por eletrospray têm sido na área da bioquímica e da química orgânica. Mas, nos últimos anos, o interesse na técnica para o estudo de organometálicos e complexos inorgânicos vem crescendo bastante. [31]

V – Equipamentos e Materiais:

V.1 – Equipamentos:

Espectrômetro de Massas:

Os espectros de massas foram adquiridos em um espectrômetro de massas LCQ Fleet Thermo-Scientific, com ionização por eletrospray em modo positivo, em colaboração com o Professor Rodinei Augusti (Departamento de Química- ICEX- UFMG).

Espectrômetro na região do Infravermelho:

Os espectros na região do infravermelho foram adquiridos em um equipamento Perkin Elmer FTIR spectrum GX, no Departamento de Química-ICEX-UFMG.

Análise elementar CHN:

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas no Departamento de Química-ICEX-UFMG, em analisador elementar Perkin-Elmer 2400.

Espectrômetro de absorção atômica:

As dosagens de Bi e Ga foram realizadas por espectrometria de absorção atômica no Departamento de Química-UFMG, em espectrômetro modelo Hitachi-Z8200 acoplado a um forno de grafite Hitachi.

Análise condutimétrica:

As medidas condutimétricas foram realizadas em um aparelho Digimed DM31. Foi feita uma solução 10^{-3} mol L⁻¹ das respectivas amostras em nitrometano.

Espectrômetro na região do Ultravioleta-Visível:

Os espectros eletrônicos foram adquiridos em um espectrômetro de duplo feixe CARY 100 VARIAN.

V.2 Materiais:

Reagentes e solventes:

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e nenhum deles passou por uma purificação antes de ser utilizado.

A linhagem celular e a sua cultura

A linhagem celular K562 foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (CR083 número da coleção RJCB). Esta linhagem celular foi estabelecida a partir de derrame pleural de uma mulher de 53 anos de idade com leucemia mielóide crônica em crise blástica terminal. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB, São Paulo, Brasil), a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. A viabilidade celular foi verificada via azul de Trypan. O número de células foi determinado por análise em contador automático Coulter.

VI - METODOLOGIA:

VI. 1- Síntese e caracterização dos complexos

Síntese do composto 1: uma solução ácida contendo 1 mmol de citrato de bismuto foi adicionada a uma solução aquosa de tetraciclina de modo a se obter a proporção [tetraciclina] : [íon metálico] igual a 1. O precipitado foi separado por filtração, lavado com água e secado sob vácuo. Obteve-se um sólido alaranjado de composição $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{Cl})(\text{OH})]$.

Síntese do composto 2: 1 mmol de nitrato de gálio foi adicionado a uma solução aquosa de tetraciclina de modo a se obter uma mistura sendo a proporção [ligante] : [íon metálico] igual a 1. O precipitado formado foi separado por filtração, lavado com água e secado sob vácuo. Obteve-se um sólido avermelhado, de fórmula $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Os compostos foram caracterizados através de análises elementares e condutimétricas, espectrometrias vibracional e de massas.

VI. 2- Caracterização das espécies complexas presentes em solução

Foram analisadas soluções do composto de bismuto (III), em metanol : água (1:1) e do composto de gálio (III), em dimetilformamida, através de espectrometria de massas, em concentrações próximas a 1 mg L^{-1} . A formação dos compostos também foi verificada por espectrofotometria de absorção na região do UV-Visível, em solução aquosa, pH 7,3.

VI. 3- Estudo do efeito dos complexos em células tumorais

Sensibilidade das células aos compostos

Para avaliação do efeito dos compostos no crescimento celular, 1×10^5 células mL^{-1} foram incubadas por 72 h na ausência e na presença de concentrações crescentes dos complexos testados. Após este tempo, as células foram contadas e a sensibilidade das células frente aos complexos foi avaliada pela concentração que inibe o crescimento celular em 50%, CI_{50} . Para o composto **1**, a faixa de concentração usada foi de 0 a $22 \mu\text{mol L}^{-1}$, e, para o composto **2**, de 0 a $15 \mu\text{mol L}^{-1}$.

VI. 4- ESTUDO DA INTERAÇÃO DO COMPOSTO 1 COM O ADN

As interações do complexo **1** com o ADN de timo de vitelo foram estudadas por espectroscopia de absorção UV-Visível.

Para o estudo das interações com o ADN, foram registrados espectros de soluções contendo $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de complexo e concentrações crescentes de ADN na faixa de a $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de ADN por nucleotídeo foi determinada pelo $\epsilon = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 260 nm. O pH foi fixado em 7,3 com 20 mmol L^{-1} de tampão HEPES. A absorvância do ADN foi subtraída pela adição de quantidades iguais de ADN na solução do complexo e na solução referência.

VII – RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII. 1- Síntese e caracterização dos complexos

Os resultados das análises elementares e condutimétricas estão na Tabela 1. A condutimetria, feita em solução 10^{-3} mol L⁻¹ em nitrometano, mostrou que o composto **1** é neutro e o composto **2** é um eletrólito do tipo 1 : 1.

Tabela 1: Dados das análises elementares e condutimétricas para os complexos **1** e **2**. Os valores entre parênteses são calculados para [Bi(C₂₂H₂₃N₂O₈)(Cl)(OH)], complexo **1**, ou [Ga(H₂O)₂(OH)₂(C₂₂H₂₄N₂O₈)]NO₃ · H₂O, complexo **2**.

Complexo	%C	%H	%N	%Bi ou Ga	Λ_M
					($\mu\text{S/cm}$)
1	37,56	3,37	4,13	30,35	23
MM= 704,87 g mol ⁻¹	(37,43)	(3,57)	(3,97)	(29,61)	-
2	40,78	4,61	6,11	9,8	71
MM= 664,22 g mol ⁻¹	(39,78)	(4,86)	(6,33)	(10,5)	-

As atribuições das absorções nos espectros de infravermelho dos complexos **1** e **2** foram feitas com base em um estudo detalhado de tetraciclinas e análogos feito por

Dziegielewski *et al.* [32]. Os espectros no infravermelho do composto 1 é da tetraciclina são mostrados na Figura 4.

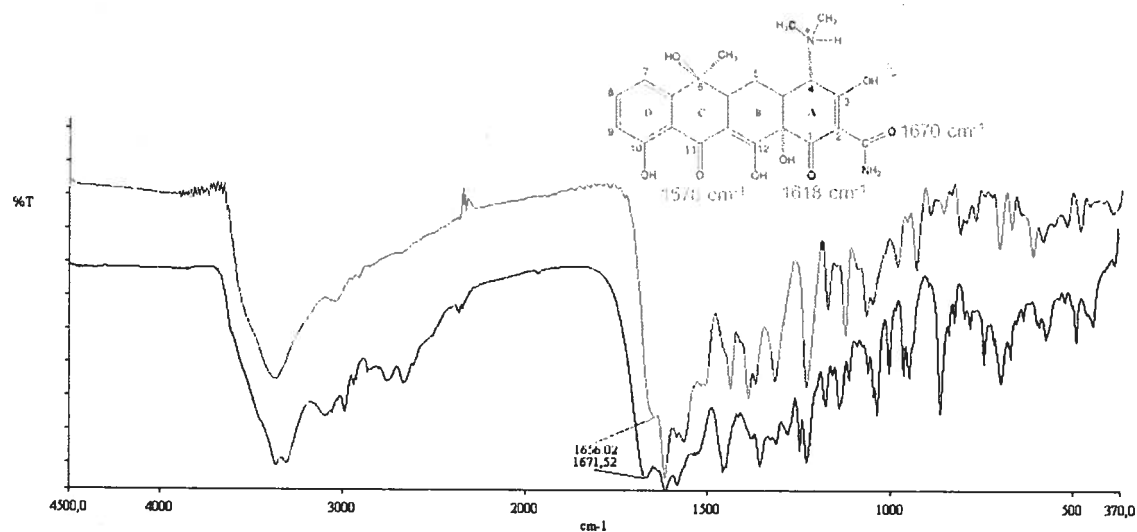


Figura 4: Espectros no infravermelho da tetraciclina (azul) e do composto 1 (vermelho).

A principal modificação observada no espectro vibracional do composto 1 está na absorção da amida. O estiramento da carbonila da amida, $\nu(\text{C}=\text{O})$, que é observado em 1672 cm^{-1} no espectro da tetraciclina, aparece em 1656 cm^{-1} no espectro do composto 1, uma variação de 16 cm^{-1} , indicando que o oxigênio do grupo amida está envolvido na esfera de coordenação. Duas bandas muito fortes, em 1618 e 1578 cm^{-1} , que são atribuídas a estiramentos das carbonilas dos anéis A e C, aparecem no mesmo número de onda, descartando a participação destes oxigênios na esfera de coordenação.

O espectro no infravermelho do composto 2 e da tetraciclina são mostrados na Figura 5.

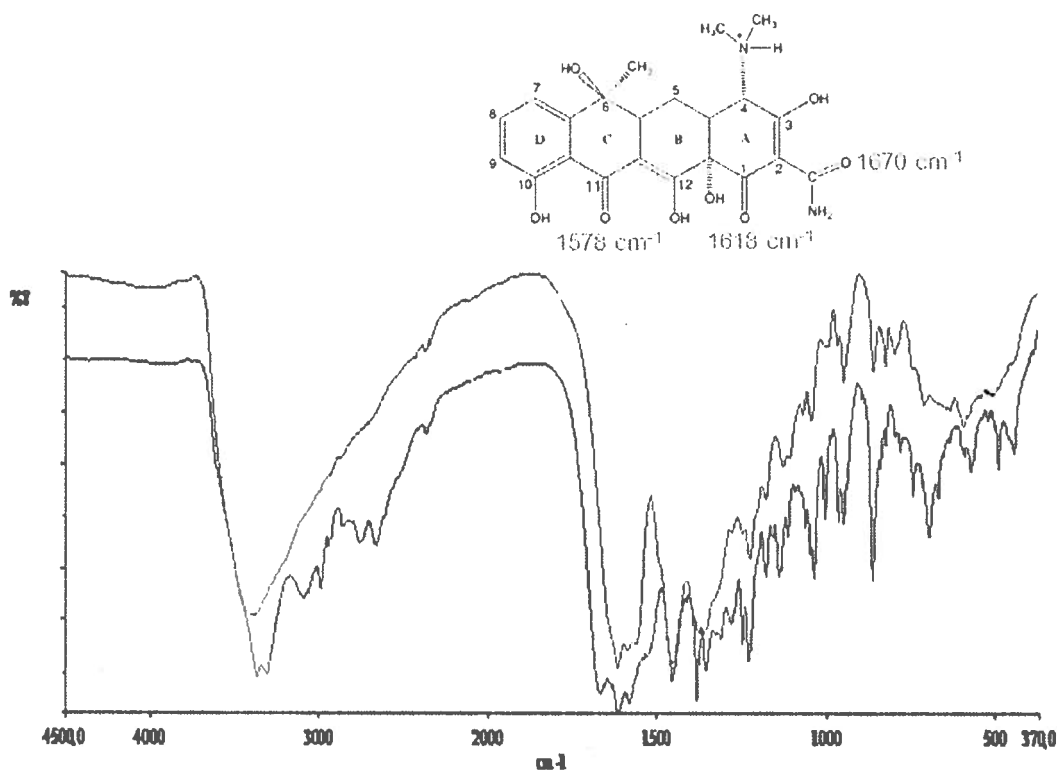


Figura 5: Espectros no infravermelho da tetraciclina (azul) e do composto 2 (vermelho).

A principal modificação observada no espectro no infravermelho do composto 2 também está na absorção da amida. O estiramento da carbonila da amida, que é observada em 1672 cm⁻¹ no espectro da tetraciclina, aparece como um ombro em 1650 cm⁻¹ no espectro do composto, uma variação de 22 cm⁻¹, indicando que o oxigênio do grupo amida está envolvido na esfera de coordenação. As outras bandas correspondentes às carbonilas dos anéis A e C não sofreram modificações, o que exclui a participação dos oxigênios dessas carbonilas na coordenação. A banda em 1384 cm⁻¹ é característica do íon nitrato livre.

Os resultados acima indicam que a tetraciclina forma complexos do tipo 1:1 com íons Bi(III) e Ga(III) via oxigênio do grupo hidroxila e oxigênio do grupo amida no anel A. Para

o composto 1, a esfera de coordenação é completada por um íon cloreto e um íon hidróxido, sendo a geometria em torno do metal tetraédrica. Para o composto 2, a esfera de coordenação é completada por 2 íons hidróxido e duas moléculas de água coordenadas, sendo a geometria em volta do metal octaédrica.

Para completar a caracterização, foi feito o estudo dos compostos em solução, que é mostrado no item V.2.

A estrutura proposta para o composto 1 está representada na Figura 6 e para o composto 2, na Figura 7.

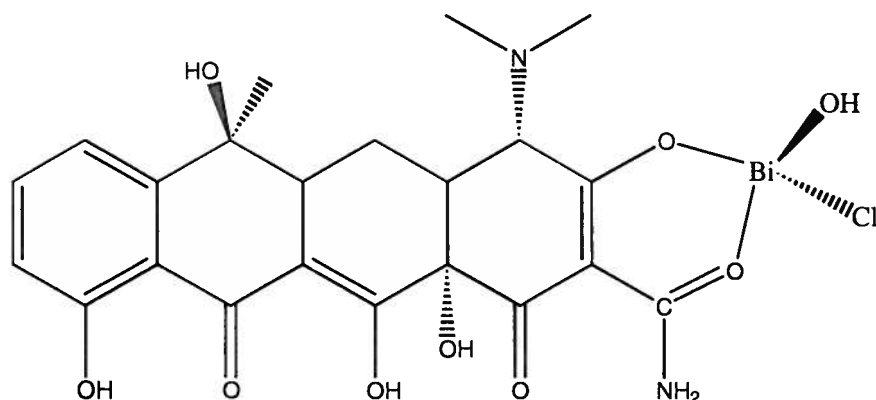


Figura 6: Estrutura proposta para o composto 1.

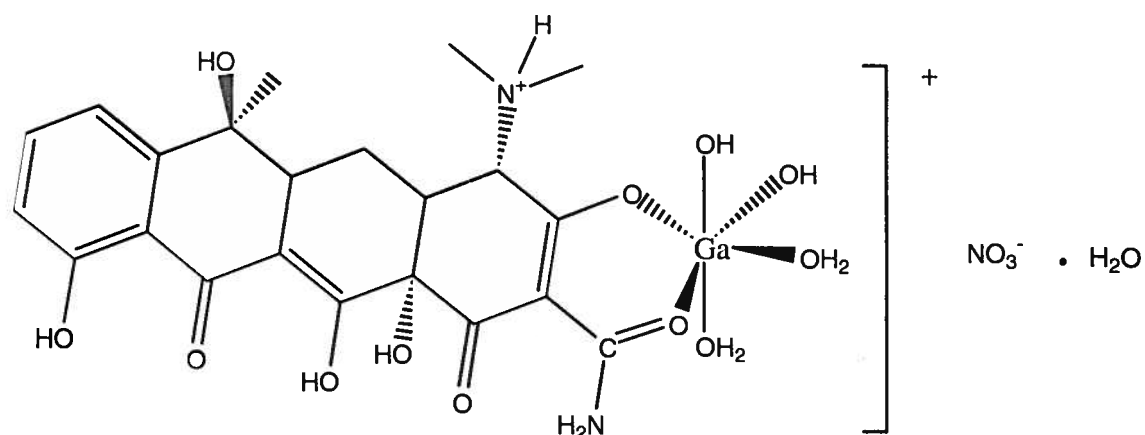


Figura 7: Estrutura proposta para o composto 2.

VII. 2- Caracterização das espécies complexas presentes em solução

Espectrofotometria UV-Visível

A molécula de tetraciclina possui duas regiões cromofóricas constituídas dos anéis A e BCD (Figura 1). O espectro de absorção de uma solução de tetraciclina em meio ácido exibe quatro bandas de absorção centradas em aproximadamente 360, 320 (ombro), 275 e 220 nm. De acordo com McCormick e colaboradores, a transição $\pi-\pi^*$ do sistema tricarbonil do anel A das tetraciclina contribui apenas para a banda em 260 nm, enquanto a transição $\pi-\pi^*$ do cromóforo BCD contribui para todas as três bandas em especial a banda centrada em 361 nm [33]. Estas transições são sensíveis à desprotonação e complexação, ou seja, a coordenação de um íon metálico modifica fortemente o espectro de absorção.

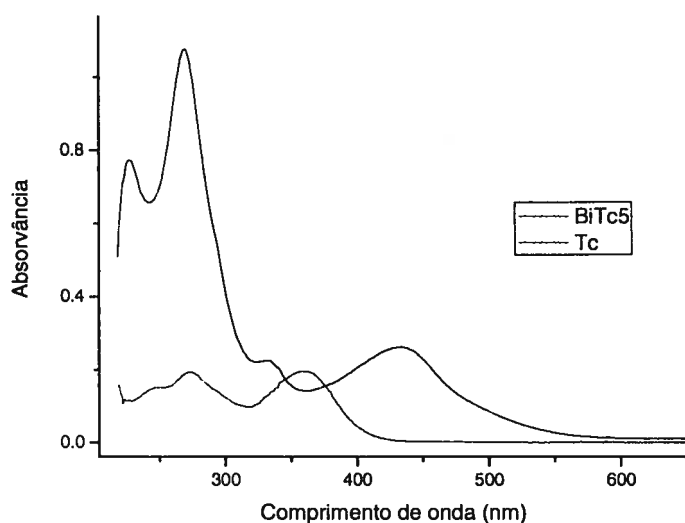


Figura 8: Espectros no UV-Vis do composto 1 (preto) e Tc (vermelho), ambos com concentração 1×10^{-5} mol L⁻¹, em tampão HEPES pH 7,2.

Na Figura 8 estão representados os espectros da Tc e de seu complexo de Bi(III), obtidos nas mesmas condições experimentais. A banda centrada em aproximadamente 273 nm no espectro do ligante sofre um efeito hiperacrômico acentuado no complexo, o que está de acordo com o envolvimento do anel A na coordenação ao bismuto. Além disto, a banda centrada em 360 nm sofre um efeito batocrômico deslocando-se para 435 nm. Estas modificações confirmam a presença do complexo em solução.

Como já foi dito, durante o processo de ionização que ocorre no ESI-MS, é comum haver a formação de novas espécies, que não estavam presentes na solução. Outro fator que pode acarretar a formação de novas espécies é o fato de a concentração do composto estar na faixa de 1 mg L⁻¹. É comum haver a formação de adutos com o sódio, que pode estar presente em solução na faixa de 20 mg L⁻¹, proveniente de impurezas de solventes e vidrarias.

O espectro de massas do composto 1 é mostrado na Figura 9.

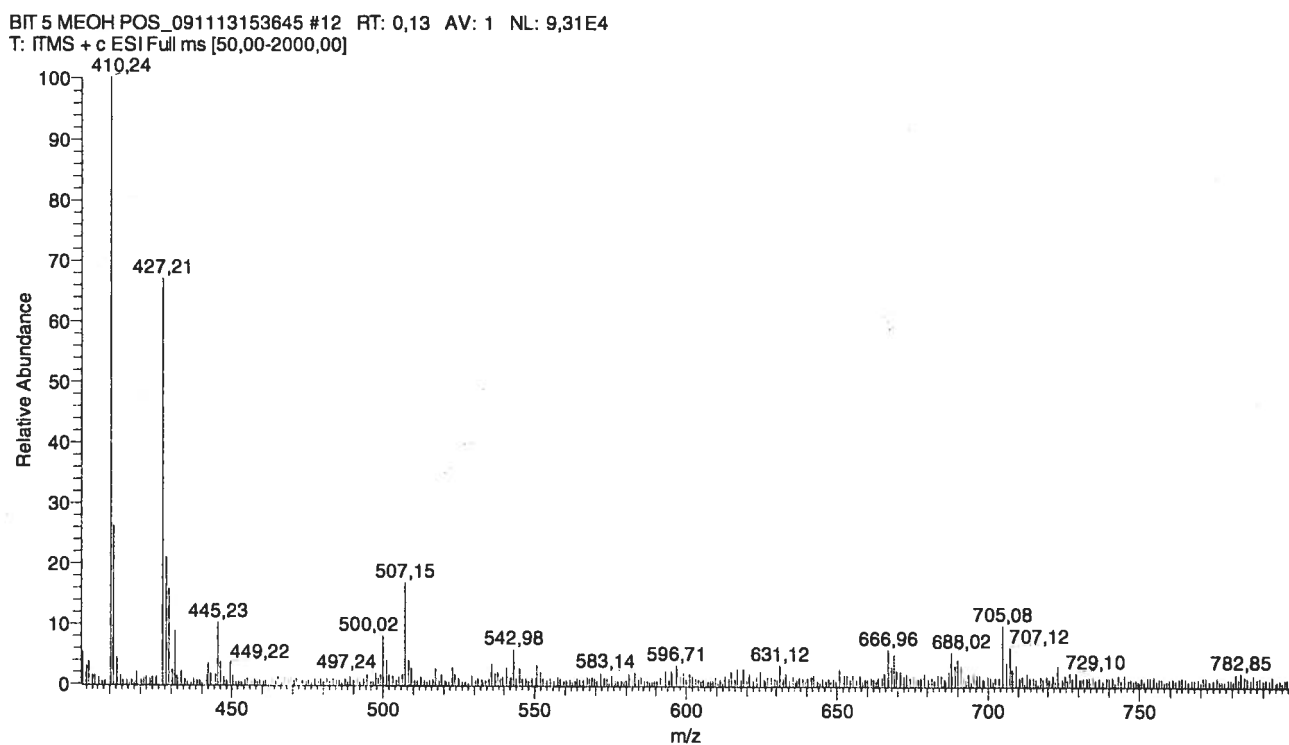


Figura 9: Espectro de massas, ESI-MS, no modo positivo, do composto $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{Cl})(\text{OH})]$.

No espectro de massas, no modo positivo, pode-se observar a presença do pico da molécula protonada, em $m/z = 705,08$, massa calculada = 705,10 (Figura 10). A presença do pico em $m/z = 688,02$ indica a perda de um hidróxido, a partir da molécula neutra, massa calculada = 688,10 (Figura 11). O pico em $m/z = 669,00$ indica a perda de um cloreto, a partir da molécula neutra, massa calculada = 669,13 (Figura 12). Para o pico em $m/z = 500,52$ foi proposta a espécie $[\text{Bi}_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})_3]^{2+}$ (Figura 13). A espécie $[\text{Bi}_2(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_8)(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})(\text{ONa})_2]^{2+}$ (Figura 14) é referente ao pico em $m/z = 507,15$. O pico em 445,23 m/z indica a presença da tetraciclina, cuja massa calculada é 445,16 (Figura 1).

A formação dos dímeros provavelmente ocorre durante o processo de concentração da gota no espectrômetro de massas ESI-MS. É muito pouco provável que espécies dinucleares estejam presentes em soluções diluídas. A fragmentação do composto neutro ocorre durante o processo de fragmentação na fonte, portanto, estas espécies também não estão presentes nas soluções originais.

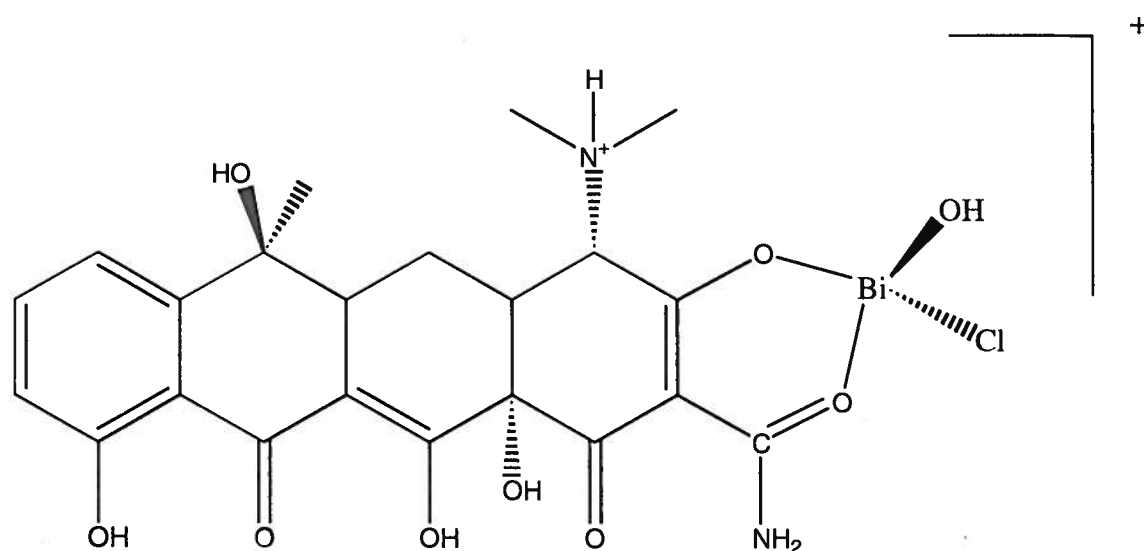


Figura 10: Possível estrutura para a espécie com m/z 705,08.

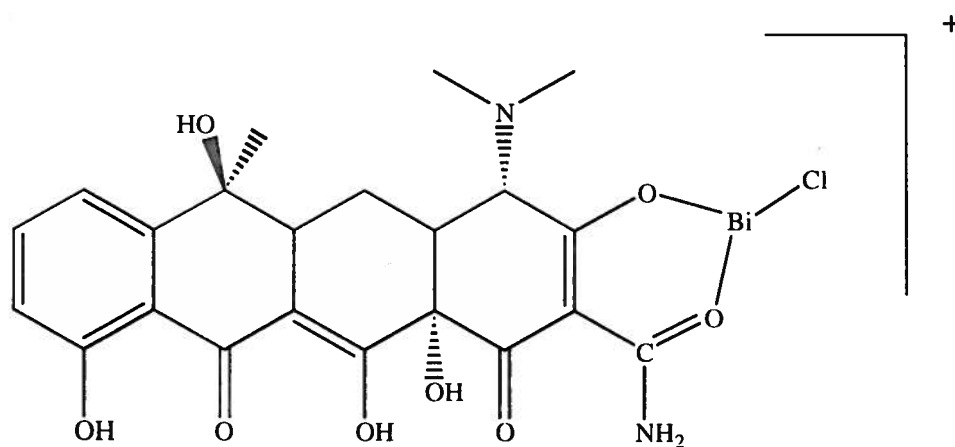


Figura 11: Possível estrutura para a espécie com m/z 688,02.

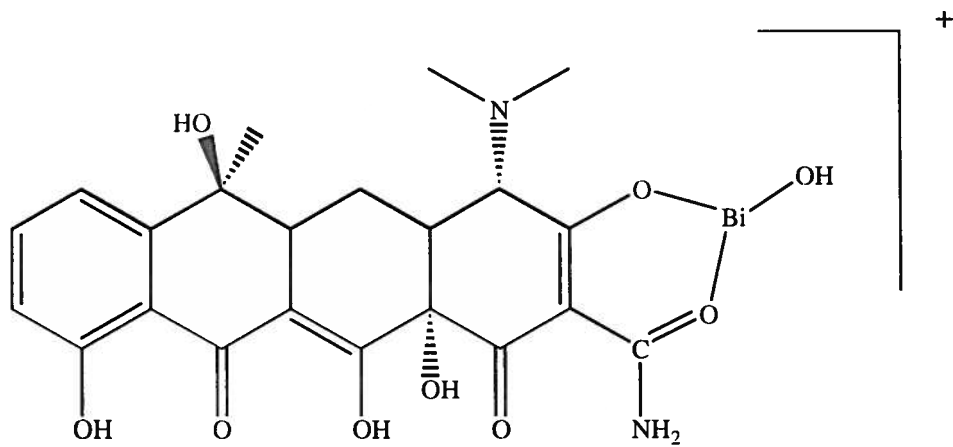


Figura 12: Possível estrutura para a espécie com m/z 669,02.

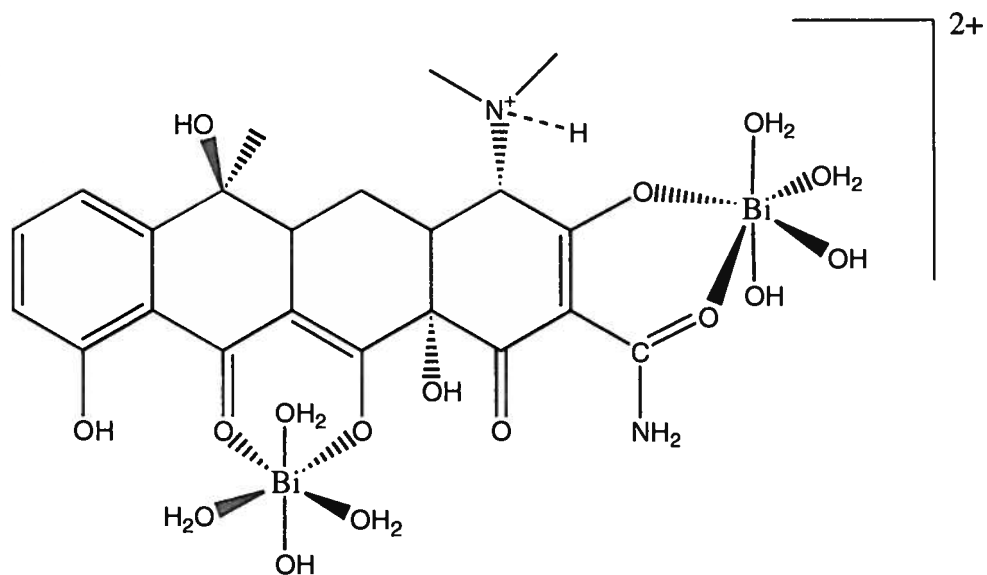


Figura 13: Possível estrutura para a espécie com m/z 500,52.

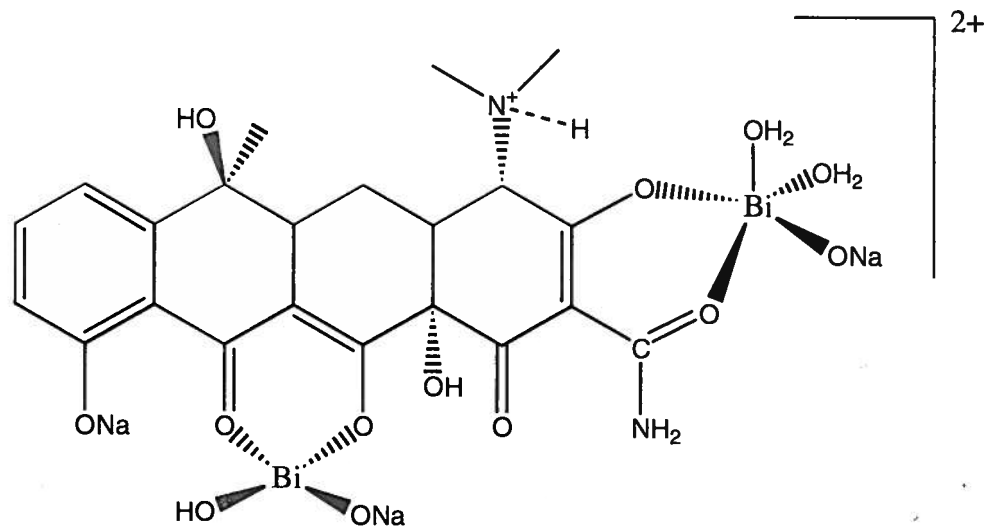


Figura 14: Possível estrutura para a espécie com m/z 507,15.

No espectro MS MS, a fragmentação do pico em m/z 705,15 (Figura 15) origina as espécies com m/z 669,00 (correspondente à perda de um cloreto, a partir da molécula neutra) e com m/z 687,94 (correspondente à perda de um hidróxido, a partir da molécula neutra). A distribuição isotópica e a razão entre massa e carga calculada para $[\text{Bi}(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{Cl})(\text{OH})]^+$ coincide com o espectro experimental, como é mostrado na Figura 16.

BIT 5 MEOH POS 705 20 eV_091113153645 #48 RT: 0,52 AV: 1 NL: 1,81E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 705,00@cid20,00 [190,00-800,00]

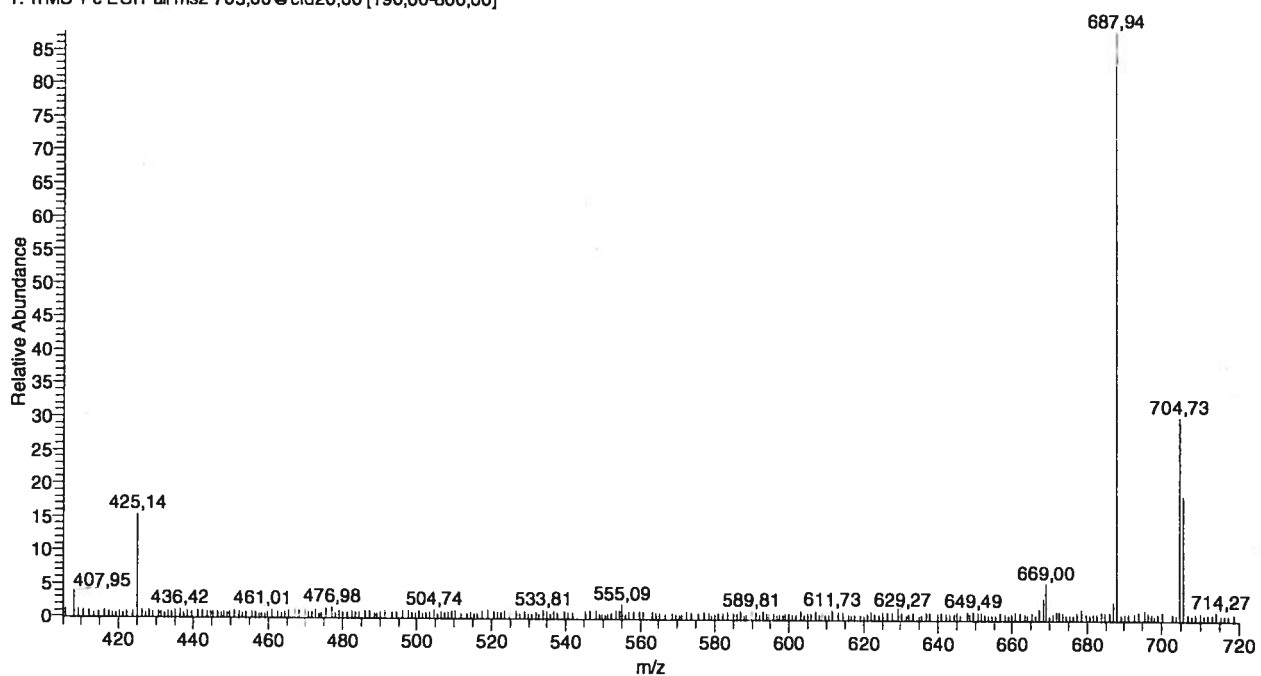


Figura 15: Espectro resultante da fragmentação do pico em 705,15.

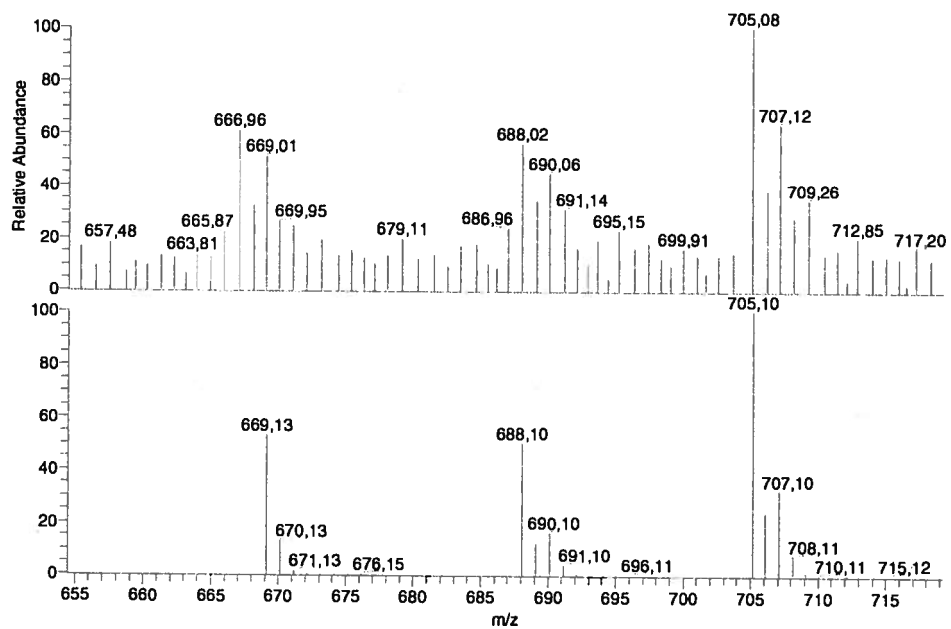


Figura 16: Espectro de massas, ESI-MS, do composto 2 no modo positivo e distribuição isotópica simulada para os compostos de Bi(III) de carga 1+.

O espectro de massas do composto **2** é mostrado na Figura 17.

Gallo TC_090602171540 #29 RT: 0,27 AV: 1 NL: 2,13E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50,00-1300,00]

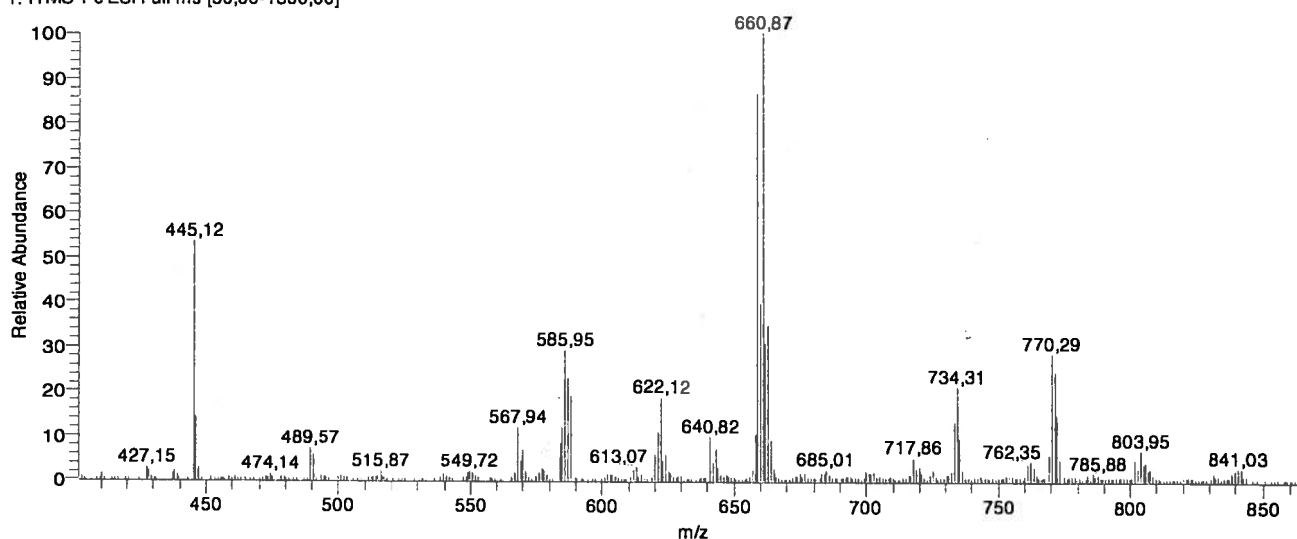


Figura 17: Espectro de massas, ESI-MS, do composto 2 no modo positivo.

No espectro de massa, no modo positivo, um pico em m/z 585,95 corresponde à espécie iônica $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na})]^+$ cuja massa calculada é 586,07 (Figura 18). O pico em m/z 567,94 corresponde à perda de mais uma molécula de água, massa calculada = 568,06 (Figura 19). As distribuições isotópicas e a razão massa carga calculadas para as espécies propostas estão em concordância com o espectro experimental. O pico em m/z 622,12 foi atribuído à espécie $[\text{Ga}(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{NO}_3)_2(\text{NaO})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ (Figura 20). O pico em m/z 640,82 foi atribuído à espécie $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Cl})_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{NaO}_8)]^+$ (Figura 21), massa calculada = 641,02. O pico em m/z 660,87 indica a presença do composto $[\text{Ga}_2(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{OH})(\text{NO}_3)]^+$ (Figura 22). A espécie $[\text{Ga}_2(\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8)_2(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8)]^{2+}$ (Figura 23) foi proposta para o pico em m/z 734,31 e a espécie $[\text{Ga}_2(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)_2(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8)(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (Figura 24) para o pico em m/z 770,29. O pico em m/z 803,95 foi atribuído à espécie $[\text{Ga}_2(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_8)(\text{NaO})(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$

(Figura 25). O pico em m/z 445,12 indica a presença da tetraciclina, cuja massa molar é 445,16 (Figura 1).

Também se observa a presença de dímeros, que provêm da concentração das gotas que ocorre no espectrômetro de massas ESI-MS, além da presença de prótons trocados por sódio, devido a presença deste como impurezas em alta concentração, como já foi dito anteriormente.

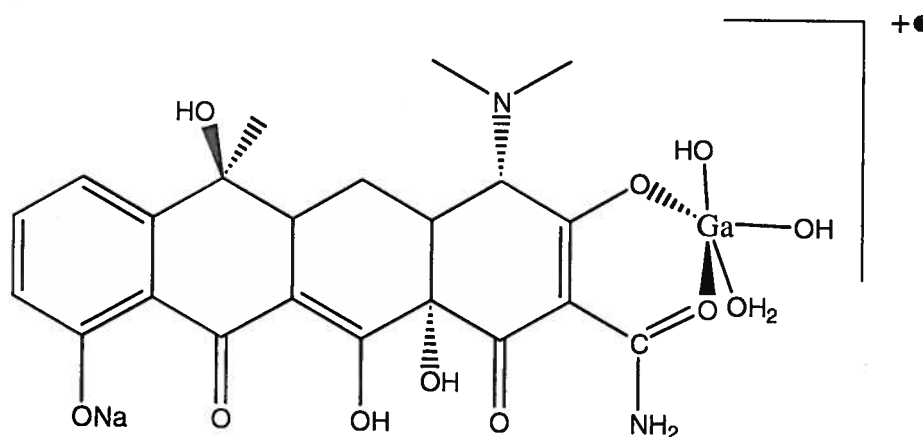


Figura 18: Possível estrutura para a espécie com m/z 585,95.

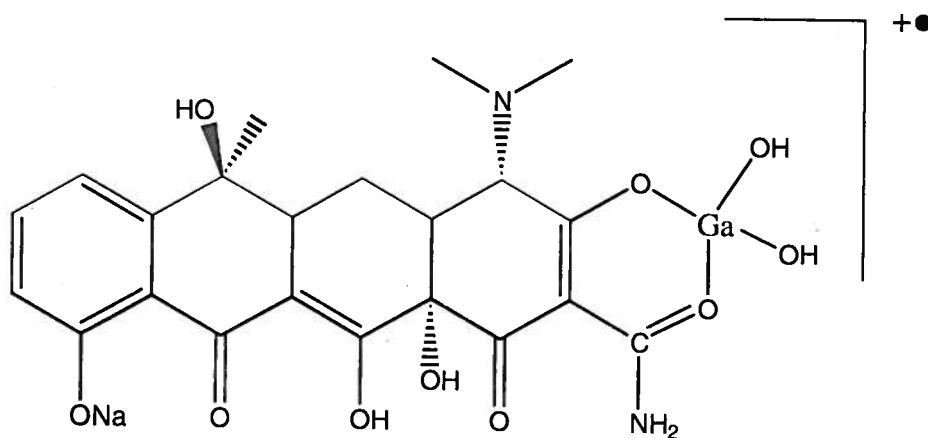


Figura 19: Possível estrutura para a espécie com m/z 567,94.

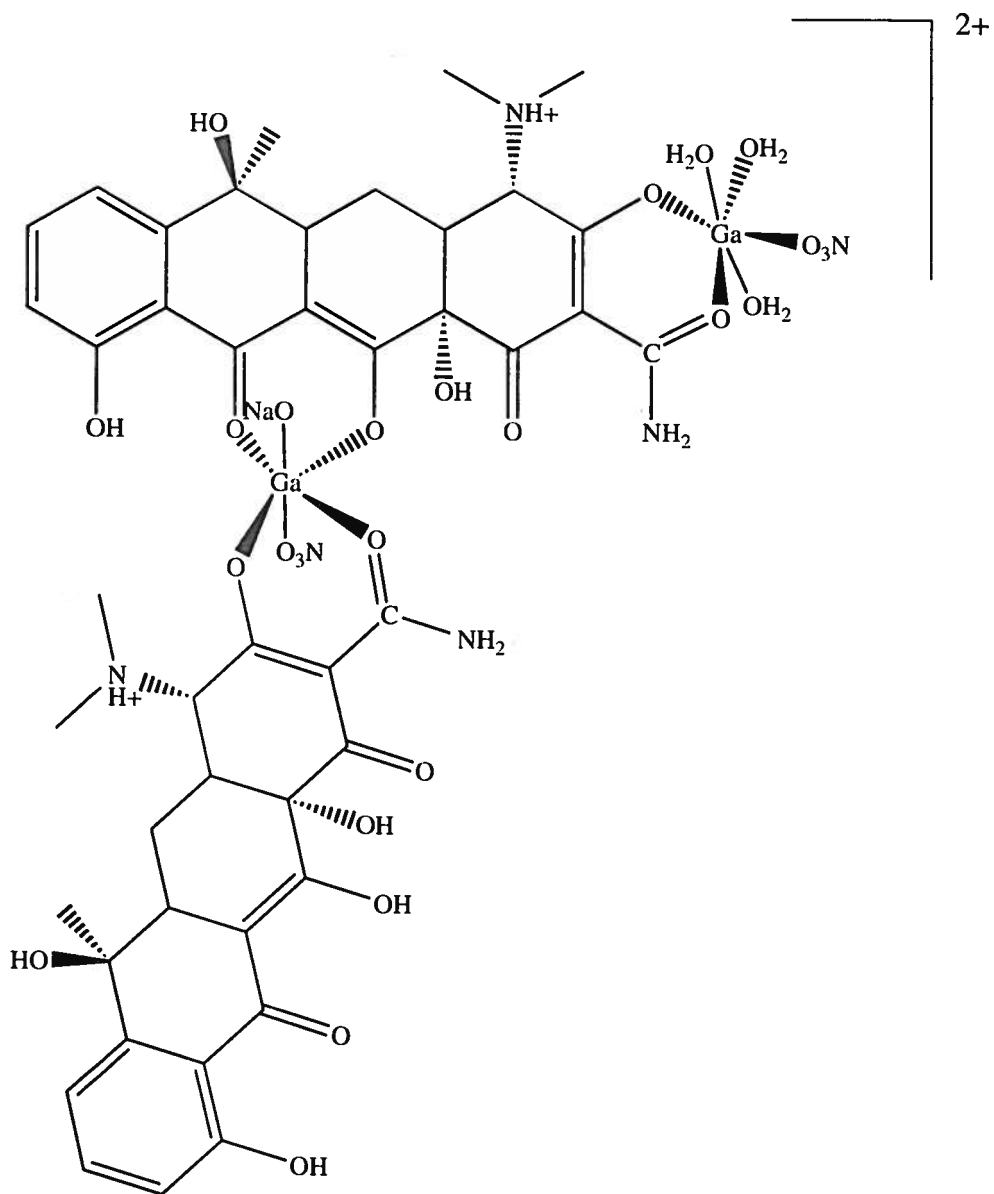


Figura 20: Possível estrutura para a espécie com m/z 622,12

