



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Alfenas/MG  
CEP 37130-000



**Avaliação da atividade antitumoral do extrato da raiz de *Caesalpinia*  
*var. peltophoroides*: isolamento, caracterização e modificação  
estrutural envolvendo a obtenção de complexos de rutênio, platina  
e vanádio**

Murilo Massoni

Alfenas/MG

2014

**MURILO MASSONI**

**Avaliação da atividade antitumoral do extrato da raiz de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*: isolamento, caracterização e modificação estrutural envolvendo a obtenção de complexos de rutênio, platina e vanádio**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para integralização do curso de Mestrado em Química da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica. Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisi Gomes Soares

**Alfenas/MG**

**2014**

Massoni, Murilo

Avaliação da atividade antitumoral do extrato da raiz de *Caesalpinia* var. *Peltophoroides* : isolamento, caracterização e modificação estrutural envolvendo a obtenção de complexos de rutênio, platina e vanádio / Murilo Massoni, Alfenas, MG. - 2014.

115 f. -

Orientadora: Marisi Gomes Soares

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. *Caesalpinia*. 2. Anticancerígenos. 3. Complexos metálicos. I. Soares, Marisi Gomes. II. Título.

CDD: 547

**MURILO MASSONI**

**Avaliação da atividade antitumoral do extrato da raiz de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*: isolamento, caracterização e modificação estrutural envolvendo a obtenção de complexos de rutênio, platina e vanádio**

A banca examinadora abaixo assina aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Áreas de concentração: Química Orgânica. Orientador: Marisi Gomes Soares

Aprovado em: 30 / 05 / 2014\_\_


Prof.<sup>a</sup> Daniela Aparecida Chagas de Paula

Instituição Universidade Federal de Alfenas


Assinatura: 

Prof.<sup>a</sup> Marli dos Anjos Cardoso

Instituição Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof.<sup>a</sup> Marisi Gomes Soares

Assinatura: 

*Aos meus pais Milton Massoni e Ana Maria. S. dos S. Massoni, e meu irmão Marcelin Massoni por sempre acreditarem em mim, dar sempre suporte, incentivo e por todo o amor dedicado, Amo muito vocês.*

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde e permitir que eu concluísse este Mestrado, por me dar forças para superar as dificuldades, me iluminando com sua sabedoria e me confortando com seu amor;

A Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela oportunidade oferecida;

Ao Professora Dr<sup>a</sup>. Marisi Gomes Soares, por me orientar com excelência, uma grande profissional e amiga a qual tenho muita admiração e um carinho especial. Muito obrigado pela oportunidade, pela paciência e pela ajuda imprescindível para conclusão desse trabalho;

A Universidade Federal de São Carlos(UFSCAR) pela parceira;

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista pela parceria, auxílio e infraestrutura disponibilizada, tornando possível a síntese e caracterização dos complexos;

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Marisa Ionta pela parceria nos ensaios de avaliação da atividade antitumoral. Muito obrigado pela dedicação e parceria.

A Pós-Doc. Marília Imaculada Frazão Barbosa pela amizade por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste trabalho e contribuir com novas ideias, pela ajuda na síntese e principalmente na caracterização dos complexos e também pela revisão na dissertação, uma pessoa fantástica e um exemplo a ser seguido. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho;

Ao Pós-Doc. Claudinei Alves da Silva pela amizade sincera, incentivos, risadas e críticas construtivas que me tornaram uma pessoa muito melhor e por me socorrer nos momentos difíceis desse trabalho;

Ao aluno de Doutorado João Luiz Baldim Zanin, pelos conhecimentos compartilhados, pelos incentivos, pela grande ajuda e principalmente pela amizade e parceria dentro e fora do laboratório;

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos pela amizade, uma pessoa que eu tenho uma grande admiração;

Ao Mr. Isael Rosa, meu grande amigo, pelos conhecimentos compartilhados, pela grande ajuda por sempre me confortar com palavras do nosso senhor Deus nos momentos de angústia. Aprendi muito com você;

As alunas de iniciação científica Ísis Siqueira e Olivia da Silva Domingos pelo apoio oferecido durante os experimentos, muito obrigada pela colaboração;

A minha Avó Jovita, pelas orações por sempre acreditar em mim. Te amo muito.

A minha tia Marisa, meu tio Miguel e minha prima Manoela, por torcerem sempre por mim;

Ao meu amor Victória do Amaral Cozer, por sempre acreditar no meu potencial, e sempre estar do meu lado nos momentos bons, e principalmente nos momentos ruins, me dando forças e incentivos e aumentando minha Fé e me tornando uma pessoa cada vez melhor;

A todos meus amigos, em especial Breno Souza Maciel, Matheus S. Vale, Paulo Siane, Marcellus Herreira Diniz (Tello), Vinicius e Matheus Bardini, Felipe Frascisco (Xitão). Muito obrigado pelos incentivos, pela amizade e parceria;

A auxiliar de limpeza do laboratório (LFQM) Glorinha pela grande amizade, sorrisos e pelo o cafezinho;

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG, pela amizade, momentos de alegria. Especialmente Jaqueline Januário, Laís, Bruna, Kris, Paloma, Fran., Weton, Carla e Kaio;

A Fabiana da PPGQ, pelo auxílio e paciência.

Aos professores, funcionários e colegas do programa de Pós-Graduação em Química pela colaboração na realização do Mestrado;

A CNPq;

A capes;

A FAPEMIG pela bolsa concedida.

.

## RESUMO

O gênero *Caesalpinia* consiste em uma fonte inesgotável de metabólitos bioativos presentes em mais de 500 espécies distribuídas em todo o mundo. Estudos fitoquímicos da *Caesalpinia* conduziram ao isolamento de uma diversificada classe de compostos, dentre eles diterpenos, esteróides e flavonoides. É conhecido da literatura que estas espécies apresentam uma vasta gama de propriedades farmacológicas, incluindo anti-úlcera, anticancerígena, anti-diabete, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anti-reumáticas. Neste trabalho foram isolados o ácido gálico, galato de propila e o biflavonoide (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) - 3 - (3 - (2,4 - dihidroxifenil) - 1 - (4 - hidroxifenil) - 3 - oxopropil) - 4H-cromen - 4-ona), a partir de raízes da *Caesalpinia* var. *peltophoroides*. Como o potencial anticancer do ácido gálico já é bem definido na literatura em diversas linhagens de células tumorais, apenas o galato de propila e o biflavonoide foram submetidos aos testes antitumorais, sendo que o segundo apresentou um  $IC_{50}$  de  $48 \pm 1,60 \mu M$  sobre a linhagem de células de hepatocarcinoma (HTC), valor muito próximo da referência, o cisplatina. Com intuito de explorar a atividade antitumoral do galato de propila, foi realizada a complexação deste à metais de transição como platina, rutênio e vanádio. Os compostos foram caracterizados por meio de técnicas de absorção na região do infravermelho e UV/Vis, análise elementar, condutividade, voltametria cíclica e de pulso diferencial, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e  $^{31}P\{^1H\}$  e difração de raios X. Os complexos  $[RuCl_2(GP)(dppb)]$  e  $[VO(GP)_2]$  obtidos apresentaram resultados promissores frente às linhagens tumorais (A549, MCF7, HepG2 e U251) mostrando que a coordenação levou à obtenção de complexos mais ativos frente às células cancerígenas, sendo que o ultimo apresentou valores de  $IC_{50} = 17.31 \pm 0.11 \mu M$  (A549),  $IC_{50} = 19.12 \pm 0.15 \mu M$  (HepG2) e  $IC_{50} = 24.03 \pm 0.21 \mu M$  (U251). Quando as linhagens A549, HepG2 e U251 foram tratadas sob as mesmas condições, com o cisplatina, um potente agente anticancer, o valor de  $IC_{50}$  encontrado foi de  $20,3 \pm 1,6 \mu M$ ,  $14.5 \pm 2,8 \mu M$  e  $21.7 \pm 1,9 \mu M$  respectivamente, comprovando que o composto apresenta um grande potencial antiproliferativo.

Palavras chave: *Caesalpinia* var. *peltophoroides*. Anticancer. Complexos Metálicos

## ABSTRACT

The genus *Caesalpinia* consists of an inexhaustible source of bioactive metabolites present in more than 500 species distributed worldwide. Phytochemical studies of *Caesalpinia* led to the isolation of a diverse class of compounds, including diterpenes, steroids and flavonoids. It is known from literature that these species show a wide range of pharmacological properties, like anti-ulcerative, anticancer, antidiabetic, antiinflammatory, antimicrobial and anti-rheumatic activities. In this work were isolated gallic acid, propyl gallate and biflavonóide (5,7 – dihidróxi – 2 - (4 - hidróxifenil) - 3-(3 -(2,4 - dihidróxifenil) - 1-(4-hidróxifenil) - 3-oxopropil) - 4H-cromen - 4 - ona), from the roots of *Caesalpinia* var . *peltophodoires*. As the anticancer potential of gallic acid are well established in the literature in several tumor cell lines, only the biflavonoide and propyl gallate were submitted to the antitumor tests, while the second showed IC<sub>50</sub> value of 1.60 mM ± 48 on line hepatocarcionoma cell ( HTC ), very close to the reference value, the cisplatin . In order to explore the antitumor activity of propyl gallate, the complexation to transition metals such as platinum, ruthenium and vanadium metals was performed. The compounds were characterized by absorption techniques, infrared and UV / Vis region, elemental analysis, conductivity, cyclic and differential pulse voltammetry, nuclear magnetic resonance spectroscopy of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H } and X Ray diffraction. The complex [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)] and [VO(GP)<sub>2</sub>] obtained showed promising results against the tumor cell lines (A549, MCF7, HepG2 and U251) by showing that coordination leads to the synthesis of more complex active front the cancer cells, while the latter showed IC<sub>50</sub> = 17.31 ± 0.11 μM(A549), IC<sub>50</sub> = 19.12 ± 0.15 μM(HepG2) and IC<sub>50</sub> = 24.03 ± 0.21 μM(U251). When A549, HepG2 and U251 lines were treated under the same conditions with cisplatin, a potent anticancer agent, the IC<sub>50</sub> value was found to be 20,3 ± 1,6 μM, 14.5 ± 2,8 μM and 21.7 ± 1,9 μM, respectively, showing that the compound has a great potential antiproliferative.

Keywords: *Caesalpinia* var. *peltophoroides*. Anti-cancer. Metal Complexes.

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas para (1) ácido gálico, (2) galato de propila e (3) do biflavonóide 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona. ....	19
Figura 2 - <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> . ....	23
Figura 3 - Fármacos de origem natural introduzidos na terapia do câncer nas últimas décadas. ....	25
Figura 4 - Potenciais fármacos anticâncer isoladas de espécies do gênero <i>Caesalpinia</i> . ....	29
Figura 5 - Complexos de Pt(II). ....	33
Figura 6 - O complexo bis-(maltolato) oxovanádio (IV). ....	34
Figura 7 - Complexos de Rutênio (III) que apresentam atividade antitumoral.....	35
Figura 8 - Vias de redução de compostos de Ru(III), dentro e fora da célula.....	36
Figura 9 - Estruturas típicas de arenos complexos de Ru(II) de fórmula geral $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ . ....	37
Figura 10 - Interações de hidrogênio que promovem ligação forte da unidade $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$ à guanina e ligação fraca com adenina. ....	38
Figura 11 - Fluxograma demonstrando as etapas do processo de cromatografia em coluna para a fração acetato proveniente do extrato bruto de raízes de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	46
Figura 12 - Fluxograma demonstrando a obtenção da substância 1 e 2 proveniente do extrato bruto de raízes de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> (CERFAc 1-21; 22-22) em Sephadex. ....	48
Figura 13 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH• dos extratos bruto da raiz de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> , e suas respectivas partições nas concentrações de 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 µg/mL no teste de antioxidante. ....	58
Figura 14 - Curva analítica obtida após a plotagem dos dados de absorvância das soluções padrões de ácido gálico nas respectivas concentrações para a obtenção do coeficiente de determinação.....	60
Figura 15 - Viabilidade celular em culturas tratadas com EBRC em concentrações de 5 a 200 µg/L. ....	62

Figura 16 - Estrutura Química da substância 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona, isolada do caule de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> ,.....	63
Figura 17 - Viabilidade celular em culturas tratadas com Caesalpinioflavona em concentrações superiores 40 µM.....	64
Figura 18 - Características morfológicas das linhagens celulares estudadas. ....	65
Figura 19 - Análise do ciclo celular de linhagens de células tumorais tratadas por 48h com biflavonóide em uma concentração de 40µM e 80 µM. A Figura representa um resumo dos resultados obtidos por citometria de fluxo. ....	66
Figura 20 - Viabilidade celular em culturas tratadas com galato de propila em concentrações de 25 a 200 µg/mL. ....	67
Figura 21 - Viabilidade celular em culturas tratadas com [RuCl <sub>2</sub> (GP)(dppb)] em concentrações de 25 a 200 µg/mL. ....	68
Figura 22 - Viabilidade celular em culturas tratadas com [VO(GP) <sub>2</sub> ] em concentrações de 25 a 200 µg/mL. ....	70
Figura 23 - Viabilidade celular em culturas tratadas com [VO(GP) <sub>2</sub> ] em concentrações de 1.56 a 25 µg/mL. ....	70
Figura 24 - Viabilidade celular em culturas tratadas com [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] em concentrações de 25 a 200 µg/mL. ....	71
Figura 25 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância 1.....	73
Figura 26 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância 1.....	73
Figura 27 - Ampliação do espectro de DEPT 135 ° da Substância 1. ....	74
Figura 28 - Estrutura química do ácido 3,4,5-triidroxibenzoico (ácido gálico). ....	75
Figura 29 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância 2.....	76
Figura 30 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância 2.....	77
Figura 31 - Espectro de DEPT 135 ° da Substância 2 .....	78
Figura 32 - Estrutura química do 3,4,5 TrihidroxiBenzoato de propila ( galato de propila).....	79
Figura 33 - Estrutura proposta e Espectro de RMN de <sup>31</sup> P{ <sup>1</sup> H} do [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ], em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	81
Figura 34 - Espectro vibracional na região do infravermelho do galato de propila.....	83

Figura 35 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].	85
Figura 36 - Estrutura ORTEP do complexo [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].	86
Figura 37 - Espectro de absorção na região do UV-visível galato, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .	90
Figura 38 - Espectro de absorção na região do UV-visível do complexo [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ], CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .	91
Figura 39 - Espectro de RMN de <sup>31</sup> P{ <sup>1</sup> H} do composto [Ru(Cl) <sub>2</sub> (GP)(dppb)].	92
Figura 40 - Espectro vibracional na região do infravermelho do [RuCl <sub>2</sub> (GP)(dppb)].	94
Figura 41 - Ampliação do espectro vibracional na região do infravermelho do [Ru(Cl) <sub>2</sub> (GP)(DPPB)] , em pastilha de KBr.	95
Figura 42 - Voltamograma cíclico do complexo [Ru(Cl) <sub>2</sub> (GP)(dppb)], utilizando eletrodo de platina vs Ag/AgCl, PTBA (0,1 mol/L) em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .	96
Figura 43 - Espectro de absorção na região do UV-visível [Ru(Cl) <sub>2</sub> (GP)(dppb)], CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .	97
Figura 44 - Estrutura proposta para o complexo [RuCl <sub>2</sub> (GP)(dppb)].	98
Figura 45 - Estrutura proposta para o complexo [VO(GP) <sub>2</sub> ].	99
Figura 46 - Espectro vibracional na região do infravermelho do composto [VO(GP) <sub>2</sub> ], em pastilha de KBr.	100
Figura 47 - Voltamograma cíclico do complexo [VO(GP) <sub>2</sub> ], (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0,1M PTBA).	101
Figura 48 - Voltamograma de pulso diferencial do complexo [VO(GP) <sub>2</sub> ], (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0,1M PTBA).	101
Figura 49 - Voltamograma de pulso diferencial do complexo [VO(GP) <sub>2</sub> ], (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0,1M PTBA).	102
Figura 50 - Espectro de absorção na região do UV-visível do complexo [VO(GP) <sub>2</sub> ], CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Codificação dos constituintes botânicos de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> . .....	42
Tabela 2 - Rendimento para extrato bruto de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	44
Tabela 3 - Rendimentos para partições obtidas das partições de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	44
Tabela 4 - Dados de absorvância obtidos através da leitura em 517nm da avaliação sequestrante de radicais DPPH• dos extrato bruto de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> , e suas respectivas partições e dos padrões AA e BHT. ....	57
Tabela 5 - Concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) do extrato bruto <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> e de suas respectivas partições, pelo teste antioxidante por DPPH•, obtidos por regressão não linear, com os respectivos desvios padrões.....	58
Tabela 6 - Resultado de Absorvância em 750nm para as soluções formadoras da curva analítica do ácido gálico, nas concentrações de 0 até 200 µg/mL. ....	59
Tabela 7 - Valores de Absorvância resultante em 750 nm para o teste FENÓLICOS TOTAIS e Porcentagem de compostos fenólicos para o extrato de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i> e suas respectivas partições. Resultado apresentado em equivalentes de ácido gálico.....	61
Tabela 8 - Descolamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (δ) da substância 1. ....	74
Tabela 9 - Descolamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (δ) da substância 2.....	78
Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos para o complexo [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]. ....	81
Tabela 11 - Dados cristalográficos do complexo [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]. ....	87
Tabela 12 - Principais comprimentos de ligações [Å] e valores de ângulos [°] selecionados para os compostos [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]. ....	88
Tabela 13 - Dados de análise elementar e condutividade do complexo [Pt(GP)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]. ....	89
Tabela 14 - Tentativa de atribuição das bandas de absorção na região do UV-vis para o complexo de platina. ....	91
Tabela 15 - Dados de análise elementar e condutividade do complexo de Ru(III)....	95

Tabela 16 - Tentativa de atribuição das bandas de absorção na região do UV-Vis para o complexo de platina. ....	98
Tabela 17 - Dados de análise elementar e condutividade molar do complexo [VO(GP) <sub>2</sub> ].CH <sub>3</sub> OH .....	103

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>µg/mL</b>	Microgramas por Mililitro
<b>µHg</b>	Micrmetros de Mercúrio
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Micromolar
<b>AA</b>	cido Ascórbico
<b>G</b>	cido Gálico
<b>ASRL</b>	Atividade Sequestrante de Radicais Livres
<b>BHA</b>	Butil-Hidrxianisol
<b>BHT</b>	Butil-Hidrxitolueno
<b>CC</b>	Cromatografia em Coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DAP</b>	Diâmetro a altura do peito
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH'</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>E.B.E.</b>	Extrato Bruto Etanólico
<b>EAG</b>	Equivalentes de cido Gálico
<b>ERFAc</b>	Extrato da Raiz Fração Acetato
<b>ERBUT</b>	Extrato da Raiz Fração Butanólica
<b>ERFHex</b>	Extrato da Raiz Fração Hexânica
<b>ERFET</b>	Extrato da Raiz Fração Etanólica
<b>ERO</b>	Espécie Reativa de Oxignio
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>EtOH/H<sub>2</sub>O</b>	Solução Etanol/gua
<b>FT</b>	Fenólicos Totais

<b>GP</b>	Galato de Propila
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória Média
<b><i>in vitro</i></b>	Fora de Sistemas vivos
<b>IV</b>	Infravermelho
<b><i>J</i></b>	Constante de Acoplamento
<b><i>m</i></b>	Multiplicidade
<b>MeOD</b>	Metanol Deuterado
<b>mg/kg</b>	Miligramas por Quilo
<b>mg/mL</b>	Miligramas por Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetros Quardados
<b>nm</b>	Namômetros (10 <sup>-9</sup> m)
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de Correlação
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>TNF-α</b>	Fator de Necrose Tumoral - alfa
<b>UV254nm</b>	Ultravioleta no λ=254nm
<b>UV365nm</b>	Ultravioleta no λ=365nm
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta-Visível
<b>v/v</b>	Proporção Volume/Volume

$\delta$

Deslocamento químico

$\lambda$

Comprimento de Onda

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
2.1	A ESPÉCIE .....	21
<b>2.1.1</b>	<b>Taxonomia e nomenclatura</b> .....	21
<b>2.1.2</b>	<b>Descrição Botânica</b> .....	22
<b>2.1.3</b>	<b>Biologia reprodutiva e eventos fenológicos</b> .....	23
2.2	PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER .....	23
2.3	NEOPLASIA.....	25
<b>2.3.1</b>	<b>Agentes externos</b> .....	26
<b>2.3.2</b>	<b>Agentes internos</b> .....	27
2.4	O POTENCIAL ANTICÂNCER DO GÊNERO <i>CAESALPINIA</i> .....	28
2.5	Compostos fenólicos .....	29
2.5	BIOINORGÂNICA .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	40
4.1	PARTE EXPERIMENTAL 1.....	40
<b>4.1.1</b>	<b>Métodos fitoquímicos empregados</b> .....	40
4.1.1.1	Coleta e identificação:.....	40
4.1.1.2	Secagem .....	40
4.1.1.3	Trituração .....	41
4.1.1.4	Pesagem .....	41
4.1.1.5	Maceração .....	41
4.1.1.6	Particionamento .....	41
4.1.1.7	Liofilização .....	43
4.1.1.8	Cromatografia em coluna (CC): .....	43
4.1.1.9	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	43
4.1.1.10	Solventes para eluição .....	43
4.1.1.11	Reveladores .....	44
<b>4.1.2</b>	<b>Massa de material vegetal e rendimento de partições</b> .....	44
<b>4.1.3</b>	<b>Isolamento do ácido gálico e galato de propila</b> .....	45
4.1.3.1	Coluna da fração acetato de raízes de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophodoires</i> (CERFAc).....	45

4.1.3.2	Coluna da fração 1-10 recolhida da partição acetato de raízes de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophodoires</i> .....	47
4.2	PARTE EXPERIMENTAL II .....	48
<b>4.2.1</b>	<b>Síntese dos complexos</b> .....	48
4.2.1.1	Atmosfera de argônio .....	48
4.2.1.2	Solventes .....	49
4.2.1.3	Reagentes químicos.....	49
<b>4.2.2</b>	<b>Instrumentação</b> .....	49
4.2.2.1	Microanálise .....	49
4.2.2.2	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho .....	49
4.2.2.3	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	50
4.2.2.4	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ $\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}$ $\{^1\text{H}\}$ .....	50
4.2.2.5	Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial .....	50
4.2.2.6	Condutividade molar .....	51
<b>4.2.3</b>	<b>Síntese dos complexos de precursores</b> .....	51
4.2.3.1	$[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$ .....	51
4.2.3.2	$[\text{VO}(\text{GP})_2]$ .....	51
4.2.3.3	$[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$ .....	52
4.3	PARTE EXPERIMENTAL III.....	52
<b>4.3.1</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante e fenólicos totais do extrato bruto de <i>Caesalpinia</i> var. <i>peltophoroides</i></b> .....	52
4.3.1.1	Determinação da atividade antioxidante .....	53
4.3.1.1.1	Teste DPPH•.....	53
4.3.1.1.2	Determinação dos fenólicos totais.....	55
<b>4.3.2</b>	<b>Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antitumoral</b> .....	55
4.3.2.1	Linhagens celulares e condições de cultura.....	55
4.3.2.2	Ensaio de viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS) .....	55
4.3.2.3	Análise do ciclo celular .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
5.1	Triagem inicial do extrato bruto e de suas respectivas partições .....	57
<b>5.1.1</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante</b> .....	57
<b>5.1.2</b>	<b>Determinação da porcentagem de compostos fenólicos</b> .....	59

<b>5.1.3</b>	<b>Atividade antitumoral</b> .....	61
5.1.3.1	Viabilidade celular .....	61
5.1.3.1.1	<i>Viabilidade celular do extrato bruto de raízes de Caesalpinia Petophoroides determinada por ensaio colorimétrico (MTS)</i> .....	61
5.1.3.1.2	<i>Viabilidade celular do galato de propila, determinado por ensaio colorimétrico (MTS)</i> .....	67
5.1.3.1.3	<i>Viabilidade celular do complexo [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)], determinado por ensaio colorimétrico (MTS)</i> .....	68
5.1.3.1.4	<i>Viabilidade celular do complexo [VO(GP)<sub>2</sub>], determinado por ensaio colorimétrico (MTS)</i> .....	69
5.1.3.1.5	<i>Viabilidade celular do complexo [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], determinado por ensaio colorimétrico (MTS)</i> .....	71
<b>5.1.4</b>	<b>Elucidação estrutural da substância 1 (Ácido galico)</b> .....	72
5.1.4.1	Análise do espectro de RMN DE <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C e DEPT 135° do ácido gálico.	72
<b>5.1.5</b>	<b>Elucidação estrutural da substância 2</b> .....	75
5.1.5.1	Espectro de RMN DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e DEPT 135 ° da amostra 2 obtida de Caesalpinia var. peltophoroides.....	75
5.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE II.....	80
<b>5.2.1</b>	<b>[Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b> .....	80
5.2.1.1	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	80
5.2.1.2	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV) .....	81
5.2.1.3	Difração de Raios X .....	86
5.2.1.4	Medidas de Condutividade Molar e Análise Elementar .....	89
5.2.1.5	Espectroscopia de Absorção na Região do UV/vis .....	90
<b>5.2.2</b>	<b>[RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)]</b> .....	92
5.2.2.1	Espectrometria de ressonância magnética nuclear de <sup>31</sup> P{H}, EPR e susceptibilidade magnética .....	92
5.2.2.2	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV) .....	93
5.2.2.3	Medidas de Condutividade Molar e Análise Elementar .....	95
5.2.2.4	Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Pulso Diferencial) .....	96
5.2.2.5	Espectroscopia de Absorção na Região do UV/vis .....	96
<b>5.2.3</b>	<b>[VO(GP)<sub>2</sub>]</b> .....	99
5.2.3.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV) .....	99
5.2.3.2	Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Pulso Diferencial) .....	101
5.2.3.3	Espectroscopia de Absorção na Região do UV/vis .....	102

5.2.3.4	Medidas de condutividade molar, análise elementar e susceptibilidade magnética.....	103
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>104</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

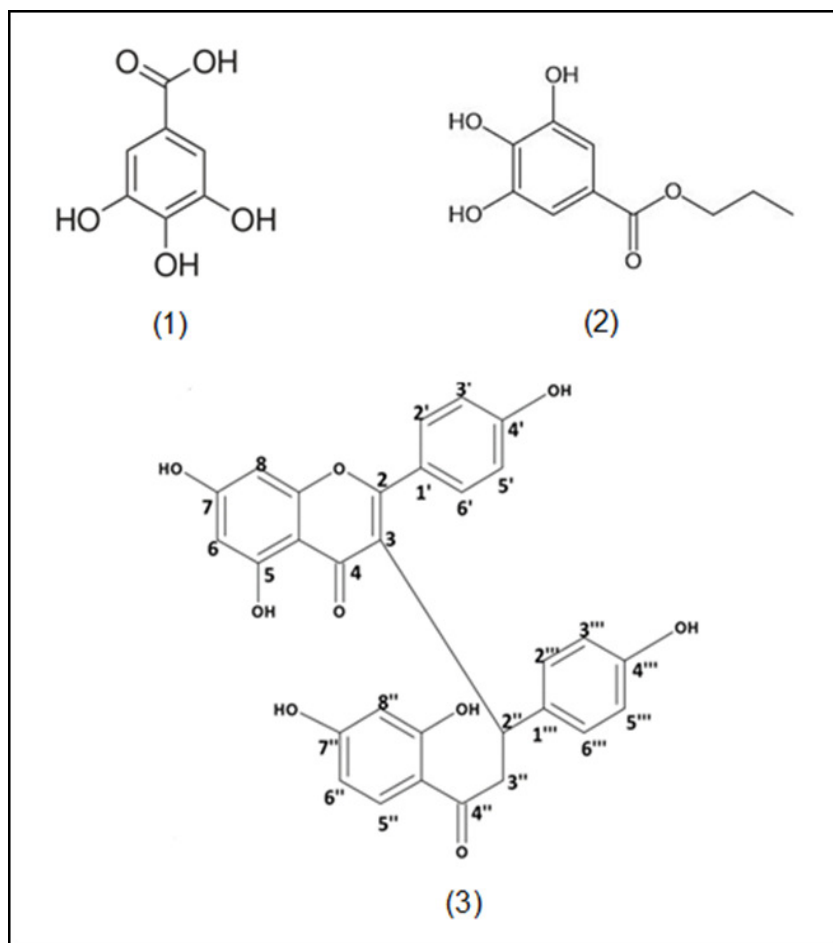
O género *Caesalpinia* pertencente à subfamília *Caesapiniaceae* ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Algumas espécies têm sido utilizadas como extrato bruto na medicina popular, em regiões onde ocorrem botanicamente (KINOSHITA et al., 2005).

Esse gênero consiste em uma fonte inesgotável de metabólitos bioativos presentes em mais de 500 espécies distribuídas em todo o mundo. Estudos fitoquímicos da *Caesalpinia* conduziram ao isolamento de uma diversificada classe de compostos, como por exemplo: diterpenos, esteroides, flavonoides entre outros (UDENIGWE et al. 2007; ZANIN et al., 2012).

Existem relatos na literatura que estas espécies apresentam uma vasta gama de propriedades farmacológicas, incluindo antiúlcera, anticancerígena, antidiabético, anti-inflamatório, antimicrobiano e antireumático. Espécies como a *C. sappan* e *C. bonduc* são utilizadas para o tratamento da inflamação e para aumento da circulação sanguínea, apresentando também propriedades antimaláricas, anti-helmínticas, no tratamento da icterícia e como digestivas (ZANIN et al., 2012).

Neste trabalho foram isolados os compostos, o ácido gálico (AG), galato de propila (GP) e o biflavonóide (5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona) (Figura 1), a partir de raízes da *Caesalpinia* var. *peltophodoires*. O biflavonóide acima citado foi isolado, porém em pequenas quantidades. Os testes e identificação foram possíveis devido à colaboração entre o aluno de doutorado João Luiz B. Zanin.

Figura 1 - Estruturas para (1) ácido gálico, (2) galato de propila e (3) do biflavonóide 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona.



Fonte: Do autor.

Os compostos (1) e (2) possuem propriedades terapêuticas, já descritas na literatura, incluindo as atividades: antitumoral, antimicrobiana e antiviral, bem como um potente antioxidante, atuando como seqüestradores de espécies reativas de oxigênio. Experimentos *in vitro*, e ensaios *in vivo* utilizando os galatos de alquila mostraram atividade contra vários tipos de linhagens de células tumorais, incluindo linhagens celulares de leucemia, melanoma, câncer de pulmão e câncer de mama (LOCATELLI et al., 2013).

Ademais, o galato de propila (GP) foi submetido a procedimentos semi-sintéticos vislumbrando uma maior atividade antitumoral com a complexação à compostos metálicos de platina, rutênio e vanádio.

Os compostos inorgânicos foram utilizados na medicina ao longo de muitas décadas, muitas vezes de uma forma empírica, sem planejar os compostos a serem

utilizados e com pouco ou nenhum conhecimento da sua estrutura molecular e de seu mecanismo de ação (RONCONI; SADLER, 2007).

A introdução do cisplatina para o tratamento clínico do câncer resultou em melhorias significativas no que diz respeito ao tratamento de diferentes tipos de neoplasias como por exemplo, no carcinoma testicular, os de melanoma, colorretal, esôfago, pulmão, linfoma, entre outros (WONG; GIANDOMENICO, 1999; NEVES; VARGAS, 2011; MONNERET, 2011).

Diversos metais foram explorados no desenho de novas moléculas como candidatos a fármacos, tais como Au(III), Ti(IV), Ga(III), Cu(II), Rh(III) e Ru(III/II). Alguns já entraram ou terminaram as fases de ensaios clínicos iniciais.

Compostos de vanádio mostraram-se efetivos como inibidores reversíveis da PTP (proteino-tirosino-fosfatase), *in vitro*. Desta forma o vanádio aumenta os níveis de fosfotirosina em vários tipos de células malignas, provocando parada da proliferação celular. Contudo, os mais promissores agentes anticâncer a base de metal, candidatos a quimioterápicos em testes clínicos são os complexos de Ru(III) (SIJA et al., 2014).

Compostos de rutênio possuem várias vantagens, dentre elas se destacam a geometria octaédrica que oferece possibilidades exclusivas ao ligar-se a ácidos nucleicos; fácil acesso aos estados de oxidações II, III e talvez IV em condições fisiológicas e a cinética de substituição de ligantes semelhante à platina (KHATTAK et al., 2013).

Uma série de compostos de Ru(III) possuindo DMSO como ligante, apresentam destaque na literatura como agentes anticâncer, dentre eles está o composto conhecido por NAMI,  $\text{Na}\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4\text{Im}(\text{DMSO})]\}$ , (acrônimo para New Anti-tumor Metastasis Inhibitor), que é ativo contra carcinoma de Lewis (pulmão), melanoma B16, carcinoma mamário MCa, ademais possui efeito anti-metastático, não apresentado pelo cisplatina (SAVA; BERGAMO, 2000; SAVA et al., 1999; BERGAMO et al., 2002).

Diante da importância supracitada do uso de metais na descoberta de novos fármacos para o tratamento do câncer, neste trabalho foram utilizados como fontes metálicas os precursores de vanádio, platina e rutênio (II e III), levando a obtenção de quatro novos complexos contendo em sua esfera de coordenação, o produto natural extraído na primeira etapa do trabalho em questão, galato de propila.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A ESPÉCIE

#### 2.1.1 Taxonomia e nomenclatura

Baseado no sistema de classificação - The Angiosperm Phylogeny Group (APG) II (2003), a posição taxonômica de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* obedece à seguinte hierarquia:

- Divisão: Angiospermae
- Clado: Eurosídeas I
- Ordem: Fabales [em Cronquist (1981), é classificada em Rosales]
- Família: Fabaceae [em Cronquist (1981), é classificada em Leguminosae]
- Subfamília: Caesalpinioideae
- Gênero: *Caesalpinia*
- Espécie: *Caesalpinia pluviosa* DC. var. *peltophoroides* (Benth.) G. P. Lewis
- Publicação: in Martius, Flora Brasiliensis 15 (2):72. 1870.
- Sinonímia botânica: *Caesalpinia peltophoroides* Benth.

A espécie apresenta nomes populares aplicados por Unidades da Federação: na Bahia, mucitaiba-verdadeira; em Minas Gerais, coração-de-negro, falso-pau-brasil e sibipiruna; na Paraíba, coração-de-negro; em Pernambuco, maria-preta, e em São Paulo, pau-brasil-do-amarelo.

Etimologia: o nome genérico *Caesalpinia* é atribuído por Linnaeus, uma homenagem ao célebre médico e botânico italiano Andrea Caesalpinio (1519-1603).

Em tupi-guarani, o termo çapo-piruna (sibipiruna) significa “raiz de casca preta” (EMBRAPA FLORESTAS).

### 2.1.2 Descrição Botânica

Forma biológica: árvore perenifólia (Figura 2). As árvores maiores atingem dimensões próximas a 28m de altura e 50 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30m do solo), na idade adulta.

Tronco: é mais ou menos reto. O fuste chega a medir até 7 m de comprimento.

Ramificação: é cimosa ou dicotômica. A copa é arredondada, moderadamente ampla, de até 6 m de diâmetro com um verde colorido muito vistoso. Na época da brotação, sua folhagem é vermelho-bronzeada.

Casca: mede até 5 mm de espessura. A casca externa ou ritidoma é áspera, cinzenta, fissurada e com marcas horizontais, resultantes das lenticelas. A casca interna é amarelo-clara.

Folhas: são bipinadas, imparipinadas, alternas, sem estípulas, com 8 a 9 pares de pinas e uma solitária, no ápice; o pecíolo mede de 2 cm a 10 cm de comprimento; cada pina com 11 a 13 pares de folíolos alternos, pequenos, falciformes ou rômnicos, quase glabros, com a base assimétrica.

Inflorescências: reunidas em inflorescências eretas, voltadas para o alto, em ráceros densos, terminais, cônicos, articuladas acima do meio do pedicelo longo, conferindo-lhe um aspecto de singular beleza.

Flores: são hermafroditas, abundantes e amarelas.

Fruto: é um legume lenhoso, plano, duro, deiscente, oblíquo, oblongo-lanceolado ou falcado, comprimido, seco liso, coriáceo, bivalvo com as valvas torcidas após a abertura, com deiscência explosiva, medindo de 7,6cm a 12,0cm de comprimento por 2,7cm a 3,1cm de largura, com um sulco em cada sutura e uma a cinco sementes.

Semente: é comprimida, irregularmente circular, transversa, ovato-obovada ou orbicular a subglobosa, com testa dura e muito rígida, clara, grossa ou sem albúmen, provida de um bico no hilo e marginada (como no pau-brasil – *Caesalpinia echinata*) (EMBRAPA FLORESTAS).

Figura 2 - *Caesalpinia* var. *peltophoroides*.



Fonte: Do autor.

### 2.1.3 Biologia reprodutiva e eventos fenológicos

Sistema sexual: *Caesalpinia* var. *peltophoroides* é uma espécie hermafrodita, tendo como polinizadores essencialmente, diversas espécies de abelhas.

Floração: de agosto a setembro, no Distrito Federal; de agosto a novembro, em Minas Gerais; de agosto a janeiro, no Estado de São Paulo; de setembro a novembro, no Paraná; de setembro a dezembro, no Estado do Rio de Janeiro, e de dezembro a janeiro, em Pernambuco.

Frutificação: os frutos amadurecem de abril a julho, em Pernambuco de abril a agosto, no Estado de São Paulo; de abril a outubro, no Estado do Rio de Janeiro; de junho a outubro, em Minas Gerais; em julho, no Distrito Federal; e de outubro a novembro, no Rio Grande do Sul (EMBRAPA FLORESTAS).

## 2.2 PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

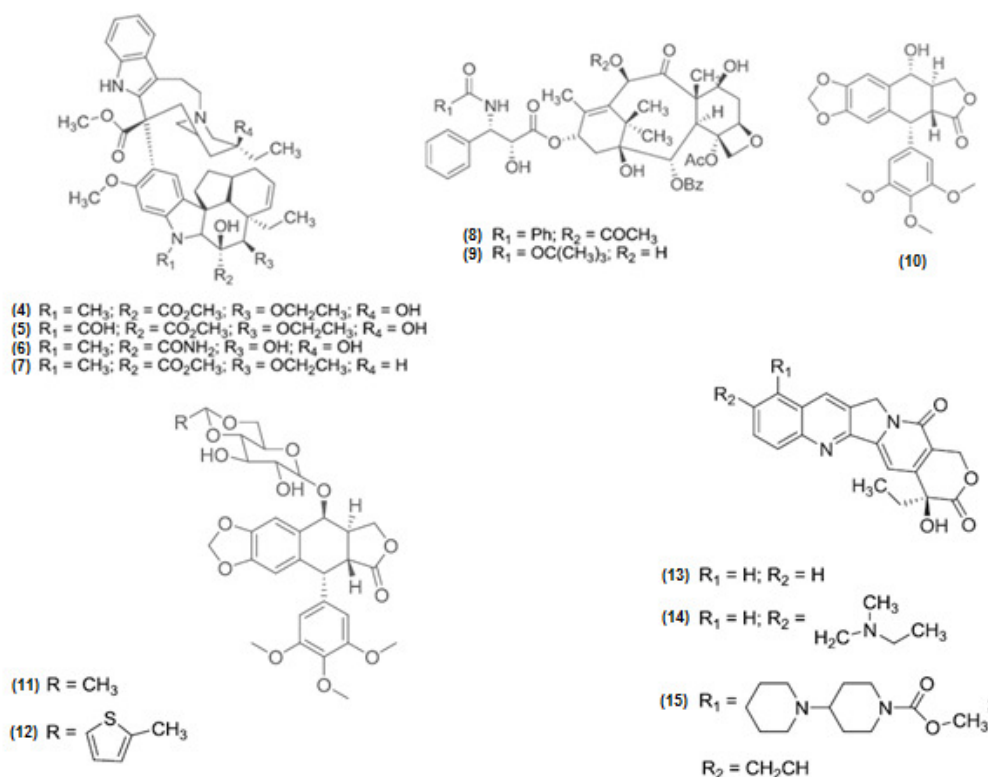
O desenvolvimento sustentável de um país depende essencialmente de uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, sustentada na preservação da natureza, na biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico, num cenário que assegura a manutenção da saúde e a cura de doenças (BRAZ-FILHO, 2010).

Neste contexto, a utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (JUNIOR; PINTO; MACIEL., 2005). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Além disso, elas fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, para a inspiração de químicos orgânicos, para enfrentar desafios na construção sintética de novas entidades moleculares, uma vez que o desenvolvimento da química farmacêutica ocorrido no século XIX as tornou uma das principais fontes de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (BRAZ-FILHO, 2010; SIMÕES et al., 2007).

Os compostos derivados de plantas têm sido uma fonte de moléculas clinicamente úteis no tratamento do câncer (CRAGG; NEWMAN, 2005). O século XX foi responsável por um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e microrganismos, no campo da oncologia ocasionando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. Aproximadamente 60% dos fármacos anticâncer desenvolvidos nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Dentre estes se destacam a vimblastina (4, Velban®) e a vincristina (5, Oncovin®) e os análogos vindesina (6, Eldisine®) e vinorelbina (7, Navelbine®); o Paclitaxel (8, Taxol®) e o análogo Docetaxel (9, Taxotere®); a podofilotoxina (10) e os análogos, etoposídeo (11, Etopophos®) e teniposídeo (12, Vumon®); e a Camptotecina (13) e os análogos Topotecano (14, Hycamtin®) e irinotecano (15, Camptosar®) (Figura 3). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (COSTA-LOTUFO et al, .2010).

Figura 3 - Fármacos de origem natural introduzidos na terapia do câncer nas últimas décadas.



Fonte: COSTA-LOTUFO et al. (2010).

Considerando a complexidade dessa doença, e considerando os diferentes tipos de novas mutações e anormalidades genéticas que promovem a capacidade de desenvolver resistência às terapias atuais (MASSEY et al., 2010), é de extrema importância a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos efetivos no tratamento do câncer que, com seus diferentes mecanismos ação, atuem de forma não genotóxica aos organismos (CHEN et al., 2010).

### 2.3 NEOPLASIA

Neoplasia é o acúmulo de mutações no genoma celular caracterizada pela proliferação descontrolada de células que levam a formação de um tumor. Existem dois tipos de neoplasia, a benigna, que é quando as células neoplásicas não se tornam invasivas, ou seja, crescem em presença de uma cápsula conjuntiva, (nesse estágio, é possível haver a remissão completa pela destruição ou remoção cirúrgica

da massa tecidual localizada) e neoplasia maligna, que se caracteriza por células neoplásicas que adquiriram uma capacidade invasiva migrando assim para tecidos adjacentes, através da corrente sanguínea ou vasos linfáticos, formando tumores secundários, denominados metástases (ALBERTS et al., 2010).

Câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizado pelo progressivo acúmulo de mutações no genoma de uma célula. Estas mutações ocasionam alterações na expressão ou função de genes-chave para a manutenção da homeostasia celular. Essas alterações genéticas podem converter uma célula normal em uma célula modificada, que se caracteriza por não mais responder aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação que governam a comunidade celular (BELTRÃO-BRAGA et al., 2004).

Em geral essas duas categorias gênicas são alteradas. Os Proto-oncogêneses que são genes que codificam proteínas associadas a regulação positiva do ciclo ou seja, estimulam a progressão do ciclo, e os supressores de tumor que são genes que codificam proteínas associadas a regulação negativa do ciclo. O que acontece numa transformação maligna é que essas duas categorias gênicas são comprometidas com mutações, os proto-oncogêneses se transformam em oncogêneses estimulam o crescimento celular que geralmente se inicia com a liberação de fatores de crescimento de uma única célula. Estes fatores ligam-se aos seus receptores na membrana da própria célula. Sinais moleculares são transmitidos então através da membrana às proteínas citoplasmáticas, que por sua vez induzem a liberação de fatores da transcrição para dentro do núcleo. Esta sequência de eventos estimula a célula a entrar em seu ciclo de divisão. A função dos genes supressores, por outro lado, é impedir a continuidade do ciclo celular, ou porque o tecido não necessita mais de reposição de células ou para impedir que a célula maligna evolua para formação de um tumor (ALBERTS et al., 2010; VERMEULEN et al., 2003).

Um grande número de agentes apresenta capacidade de provocar lesão e induzir transformação neoplásica das células, sendo eles externos e internos.

### **2.3.1 Agentes externos**

- ✓ Agentes Físicos, como luz ultravioleta e radiação ionizante.

- ✓ Agentes biológicos, como alguns tipos de vírus, que se integram ao genoma celular interrompendo seqüências gênicas ou promovendo rearranjos gênicos.
- ✓ Agentes químicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas.

### **2.3.2 Agentes internos**

- ✓ Dieta, alguns efeitos hormonais, fatores genéticos e idade que são estresses oxidativos gerados por produto natural do metabolismo. (WALLACE, 2002)

São esses fatores que levam ao processo de carcinogênese que pode ser definida como um processo de etapas múltiplas, gerando nas células uma transformação maligna irreversível devido às mutações sofridas pelo DNA (PEREIRA et al., 2008).

A carcinogênese é definida em três estágios: estágio de iniciação, estágio de promoção e estágio de progressão. O primeiro estágio da carcinogênese é denominado como a fase de iniciação, onde as células sofrem o efeito da substância carcinogênica que provoca modificações de seus genes. Nesse estágio, as células encontram-se geneticamente modificadas, tornando-se mutantes e potencialmente capazes de dar origem a um tumor. Se essa mutação da célula iniciada não for reparada, ou não for induzida a apoptose, a célula passa para o estágio seguinte de promoção perdendo assim a chance de retornar a ser uma célula saudável. No entanto, somente a iniciação isolada, não é suficiente para a formação do tumor. No estágio de promoção, as células que foram geneticamente alteradas sofrem a ação de substâncias classificadas como oncopromotoras, que tem como principal característica a proliferação da célula iniciada, contribuindo assim para o desenvolvimento de mutações adicionais, e finalmente levando a formação da neoplasia maligna. Entrando para que ocorra essa transformação da célula iniciada em célula maligna, é necessário um longo e contínuo contato com o agente oncopromotor. No último estágio denominado progressão, é observada a multiplicação descontrolada da célula com o acúmulo de mutações múltiplas, ocorrendo a formação de tumores com características invasivas com capacidade de gerar metástases. Essa fase é caracterizada por um processo irreversível onde o câncer está instalado no organismo e evolui até as primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA et al., 2005; BELTRÃO-BRAGA; TEIXEIRA; CHAMAS., 2004; PEREIRA et al., 2008).

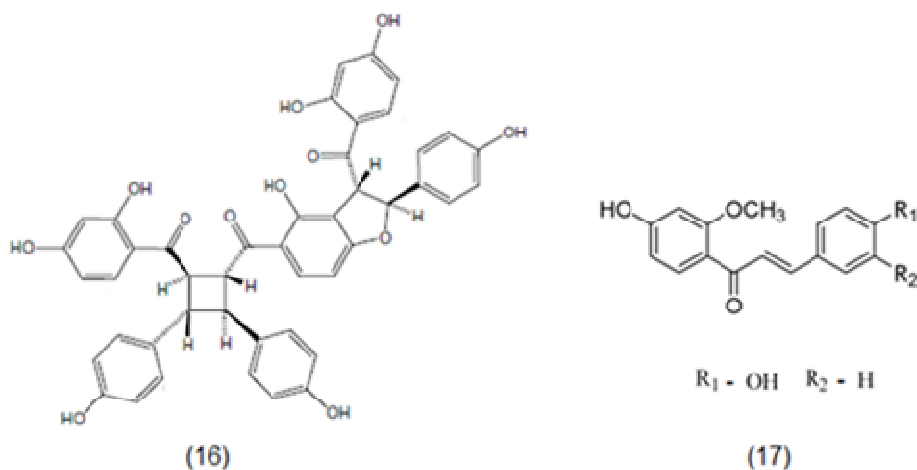
## 2.4 O POTENCIAL ANTICÂNCER DO GÊNERO *CAESALPINIA*

Algumas espécies do gênero apresentam atividade anticâncer, como exemplo, a chalcona (16) (Figura 4), isolada do caule de *C. ferrea Mart* promoveu a inibição da topoisomerase II de células leucêmicas HL60 humanas, com valor de IC<sub>50</sub> de 2,1 µM, valor este muito semelhante a do medicamento existente no mercado, o doxorubicin. O composto também apresentou efeito inibitório significativo sobre a proliferação de células HL60, com valor de IC<sub>50</sub> de 5,2 µM. As células HL60 tratadas apresentaram características indicativas de apoptose, tais como a condensação nuclear e fragmentação, e formação de escada do ADN, sugerindo que a apoptose é induzida por uma das células HL60 e, conseqüentemente, inibe a proliferação celular (NOZAKI et al., 2007).

Do cerne da *C. sappan L.* foi isolado uma chalcona (17) (Figura 4) que apresentou potencial inibição do crescimento das células de câncer bucal. O principal mecanismo de inibição de crescimento foi a indução de apoptose, mostrando-se um potencial agente quimioterápico para o tratamento de câncer bucal (LEE et al., 2010).

Em um estudo realizado com extrato etanólico obtido a partir das cascas de raízes da *Caesalpinia crista*, foi possível investigar a atividade anticancerígena em camundongos portadores do Carcinoma de Ehrlich Ascites (EAC) (NISHANT et al., 2011).

Figura 4 - Potenciais fármacos anticâncer isoladas de espécies do gênero *Caesalpinia*.



Fonte: NOZAKI et al (2007); LEE et al (2010).

## 2.5 Compostos fenólicos

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUZA et al., 2007).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. (SOUZA et al., 2007).

O ácido gálico (AG), ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, um trifenol de origem natural do metabolismo de plantas é conhecido principalmente pela sua potente atividade antioxidante. Estudos anteriores têm demonstrado que estes compostos possuem propriedades terapêuticas potentes, incluindo antiinflamatória,

antimicrobiana, antiviral e promissora atividade antitumoral (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Na literatura é reportado que o AG promoveu a inibição da linhagem humana (SW1353) em dose, tempo e modo dependente. O exame morfológico das células tratadas com AG exibiu características típicas de morte celular, tais como arredondamento das células e encolhimento celular. Ensaio complementares de cicatrização indicam que o AG inibiu as habilidades migratórias de células SW1353 (LIANG et al., 2014).

Em estudo na linhagem de leucemia mielóide crônica (K562O), o AG reduziu a viabilidade das células K562 em uma dose e tempo de modo dependente, levando a paralisação do ciclo celular na fase G0/G1 (CHANDRAMOHAN et al., 2012).

Além do mais, demonstrou atividade citotóxica para as células do câncer de próstata DU145, com morte celular induzida por apoptose, bloqueando o crescimento de células DU145 nas fases G2/M (CHEN et al., 2009).

HO e colaboradores 2010 reportaram o efeito inibitório em camundongos, na metástase de células tumorais de câncer de estômago e no crescimento invasivo por meio do aumento da expressão de RhoB, regulação negativa de sinais / GTPase pequenas AKT e inibição da atividade de NF- $\kappa$ B (HO et al., 2010).

O AG mostrou-se eficiente na redução de células do câncer de mama MCF-7 (HSU et al., 2011).

Em uma avaliação dos efeitos do AG sobre células de carcinoma cervical (HeLa) e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) em relação à inibição do crescimento e morte celular, pode-se observar que o AG inibiu o crescimento de células HeLa e de HUVEC, levando a morte celular através da apoptose (YOU et al., 2010).

O AG apresentou inibição sobre o crescimento de fibroblastos pulmonares humanos primários (HPF) e no crescimento de células A549 de carcinoma de pulmão por indução de apoptose acompanhado pelo aumento de ROS e depleção de GSH (YOU et al., 2011).

Além da atividade anticâncer nas linhagens celulares citadas acima, o AG também se mostra efetivo nas linhagens (KATO III) de câncer de estômago, (COLO 25) adenocarcinoma de colón, (3T3L1) tecido adiposo e (22Rv1) carcinoma de próstata, (U87) e (U251) células de glioma (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013). Desta

forma, tornando o AG um potencial agente no tratamento de diversos tipos de câncer.

Alguns derivados de ácido gálico, tais como os galatos de metila, propila, octila e dodecila são amplamente utilizados na fabricação de alimentos, na indústria farmacêutica e cosmética, e também apresentam propriedades terapêuticas potentes, incluindo antitumoral. A diferença entre os derivados de ésteres é apenas no número de átomos de carbono da cadeia lateral de hidrocarbonetos alifáticos, dando-lhes diferentes características físico-químicas, especialmente lipofilicidade. As alterações químicas na molécula de ácido gálico podem modificar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, alterando a solubilidade e o grau de ionização (LOCATELLI et al., 2013).

O Galato de propila (GP), é caracterizado por um éster propílico derivado do ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, é também muito utilizado como materiais de embalagem de alimentos, antioxidante em alimentos processados prevenindo a degradação e na indústria de cosméticos. O GP também é um composto constante na lista EUA Food and Drug Administration, desempenhando um papel de preservação e estabilização de preparos medicinais (HAN et al., 2010).

Alguns relatos em relação a sua atividade antitumoral são descritos na literatura. Em uma avaliação dos efeitos do GP sobre células de carcinoma cervical (HeLa) em relação à inibição do crescimento e morte celular, o GP inibiu o crescimento de células HeLa e induziu as células a apoptose em 24hrs, levando a paralização do ciclo celular na fase G1 (HAN; PARK, 2009).

Em estudo realizado por Serrano *et al* 1998, foi possível observar o efeito antiproliferativo na linhagem de linfoma de camundongo (Wehi 231), mostrando evidências de morte celular por apoptose (SERRANO et al. 1998).

Além do mais, o GP foi avaliado frente a linhagens de células endoteliais da artéria pulmonar de bezerro (CPAEC) e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). O GP administrado inibiu o crescimento sobre as duas linhagens CPAEC e de HUVEC em 24 h. O GP induziu a morte celular em CPAEC, que foi acompanhada pela perda de potencial de membrana mitocondrial (MMP; LPI) (HAN et al., 2010).

Chen e colaboradores mostraram que o GP apresentou inibição e linhagens de células leucêmicas humanas HL-60 e THP-1 (CHEN et al., 2011; FIUZA et al., 2004).

## 2.5 BIOINORGÂNICA

Em vista dos problemas de resistência e dos efeitos colaterais, pesquisadores de todo o mundo têm buscado planejar novos fármacos a partir de modificações estruturais naqueles existentes. Nesse âmbito, destaca-se a química biorganometálica, que se encontra na interface entre a química organometálica e a biologia. Nos últimos anos esta nova área de pesquisa tem despertado interesse, uma vez que a incorporação de metais de transição à estrutura de um composto pode acentuar a sua atividade biológica (MONNERET, 2011).

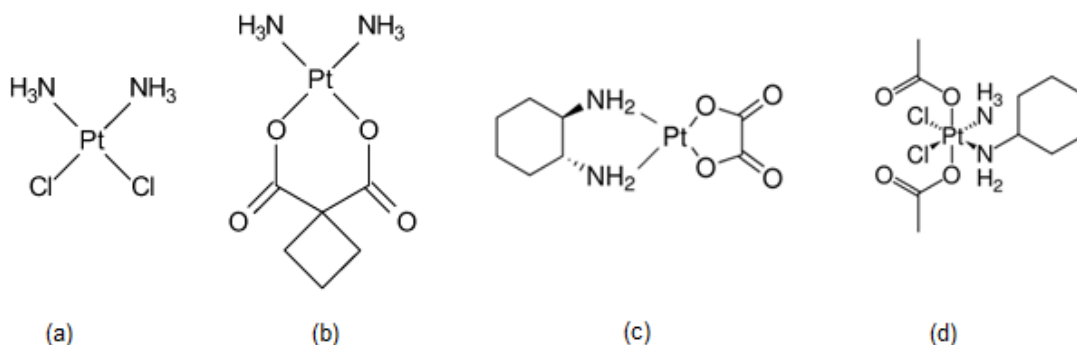
A introdução do cisplatina para o tratamento clínico do câncer resultou em melhorias significativas no que diz respeito ao tratamento de diferentes tipos de neoplasias como por exemplo no carcinoma testicular onde é considerado um dos agentes mais eficazes, cuja a taxa de cura total chega ser de 90%, e cerca de 100% se for diagnosticada no primeiro estágio (MONNERET, 2011). O cisplatina também é usado no tratamento de outros tipos de cânceres, como os de melanoma, colorretal, esôfago, pulmão, linfoma, entre outros (WONG; GIANDOMENICO, 1999; NEVES; VARGAS, 2011).

As investigações sobre o mecanismo de ação do cisplatina apontam que o cisplatina reage com várias biomoléculas no nosso organismo, especialmente com aquelas que contêm grupos de nitrogênio e enxofre podendo o metal interagir com sítios contendo pares de elétrons livres, especialmente átomos de nitrogênio. Dessa maneira, acredita-se que deve ocorrer formação de um complexo cíclico com o DNA, o que seria responsável pela sua ação antitumoral (JAMIESON; LIPPARD, 1999).

A busca por novos compostos no intuito de diminuir os efeitos adversos, o cisplatina passou por modificações químicas em sua estrutura. Desde então, complexos metálicos com centro de platina tornaram-se alvos de grande interesse na investigação da atividade citotóxica e antitumoral (JAMIESON; LIPPARD, 1999). Neste contexto, o cisplatina [cis-diaminadichloroplatina (II)], o carboplatina [diamina(ciclobutano-1,1-dicarboxilato) platina (II)] e o oxaliplatina [(trans-L-diaminaciclohexano) oxalatoplatina (II)], Figura 5, são atualmente os únicos agentes contra o câncer a base de metal em uso clínico mundial. Cerca de 40 complexos de platina têm sido investigados em triagem clínica até a atualidade. Destes, o satraplatina, bis(acetato-O)aminodichloro(ciclo-hexilamina) platina (IV), um complexo octaédrico, é o mais interessante candidato em um avançado estágio clínico, fase IV

(Figura 5). A vantagem do satraplatina é que pode ser administrado oralmente em função da sua inércia cinética, diferente dos complexos quadrados planares de Pt(II) clinicamente estabelecidos, os quais são administrados intravenosamente (JAKUPEC et al., 2008; BERGAMO et al., 2012).

Figura 5 - Complexos de Pt(II), onde:  
 a) cisplatina  
 b) carboplatina  
 c) oxaliplatina  
 d) satraplatina



Fonte: Do autor.

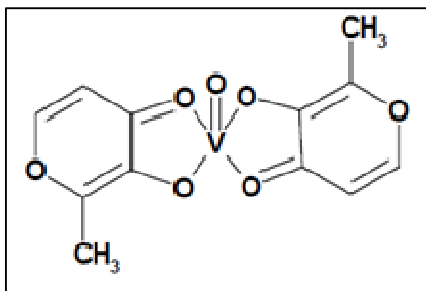
É estimado que 50-70% dos pacientes com câncer no mundo são tratados com o cisplatina (VACCARO et al., 2009). Os compostos de platina, sozinhos ou em combinação com outras moléculas, são usados para tratar de 40 a 80% dos pacientes com câncer, confirmando a importância destes compostos para o tratamento do mesmo, além de encorajar a busca por novos fármacos mais eficientes (NEVES; VARGAS, 2011).

A maioria dos pesquisadores têm direcionado suas pesquisas para a obtenção de complexos que apresentem atividades antitumorais com outros metais de transição, trazendo possíveis vantagens em relação aos compostos de platina, tais como a presença de sítios de coordenação adicionais, alterações na afinidade do ligante pelo metal e da cinética de substituição, mudanças no estado de oxidação, possibilidade de utilização na terapia fotodinâmica e a apresentação de menores, ou de nenhum efeito tóxico (MALINA et al., 2001; CLARKE, 1999).

Complexos formados por vanádio e ligantes orgânicos geralmente apresentam baixa toxicidade e são solúveis em meio aquoso. O complexo bis-(maltolato) oxovanádio (IV) (Figura 6), é um complexo que biomimetiza a insulina e,

é o único fármaco administrado, por via oral, com este propósito e é três vezes mais potente que seu sucessor na indústria farmacêutica, o VOSO<sub>4</sub>, administrado por via intramuscular (BENITE, 2007). Estudos mostram que compostos de vanádio, são uteis no tratamento da síndrome da imunodeficiência, e também apresentam atividade antitumoral (CUEVAS et al., 2012).

Figura 6 - O complexo bis-(maltolato) oxovanádio (IV).



Fonte: Do autor.

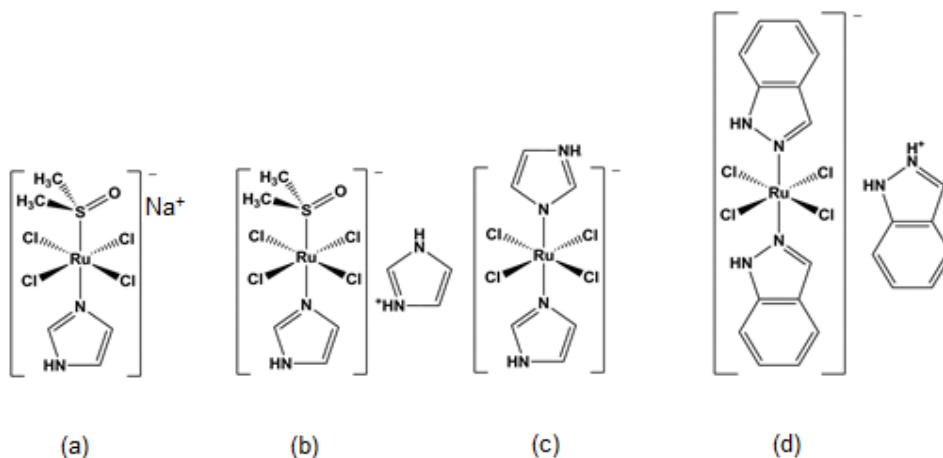
Compostos de vanádio mostraram-se efetivos como inibidores reversíveis da PTP (proteino-tirosino-fosfatase), *in vitro*. Desta forma o vanádio aumenta os níveis de fosfotirosina em vários tipos de células malignas, provocando parada da proliferação celular. Contudo, os mais promissores agentes anti-câncer a base de metal, candidatos a quimioterápicos em testes clínicos são os complexos de Ru(III) (SIJA et al., 2014).

Muitos compostos de Ru(III) possuindo DMSO como ligante, apresentam destaque na literatura como agentes anticâncer, entre eles está o composto conhecido por NAMI, Na{*trans*-[RuCl<sub>4</sub>Im(DMSO)]}, (acrônimo para *New Anti-tumor Metastasis Inhibitor*), que é ativo contra carcinoma pulmonar de Lewis, células de melanoma de camundongo (B16) e carcinoma mamário(MCA) e possui um efeito antimetastático, não apresentado pelo cisplatina (SAVA; BERGAMO, 2000; SAVA et al., 1999; BERGAMO et al. 2002). O NAMI-A é derivado do NAMI, [ImH]{*trans*-[RuCl<sub>4</sub>(Im)(DMSO)]}, (Figura 7) pela substituição do Na<sup>+</sup> por ImH<sup>+</sup>, foi o primeiro complexo de rutênio a entrar em testes clínicos. Estes complexos apresentam uma baixa toxicidade, não mostrando atividade na inibição do crescimento de tumores primários, assim como não exibem citotoxicidade contra células tumorais *in vitro*, porém mostram efeito antimetastático que afetar a mobilidade das células cancerosas (SIJA et al., 2014; SAVA; BERGAMO, 2000; SAVA et al., 1999; BERGAMO et al.

2002; SAVA et al., 1999). Foi comprovado que o NAMI-A não exibe citotoxicidade em células tumorais *in vitro*, mas sim *in vivo*, (NAMI-A é um composto que *in vitro* apresenta efeitos pró-adesivos que recentemente completou a fase II dos testes clínicos (RADEMAKER-LAKHALI et al., 2004).

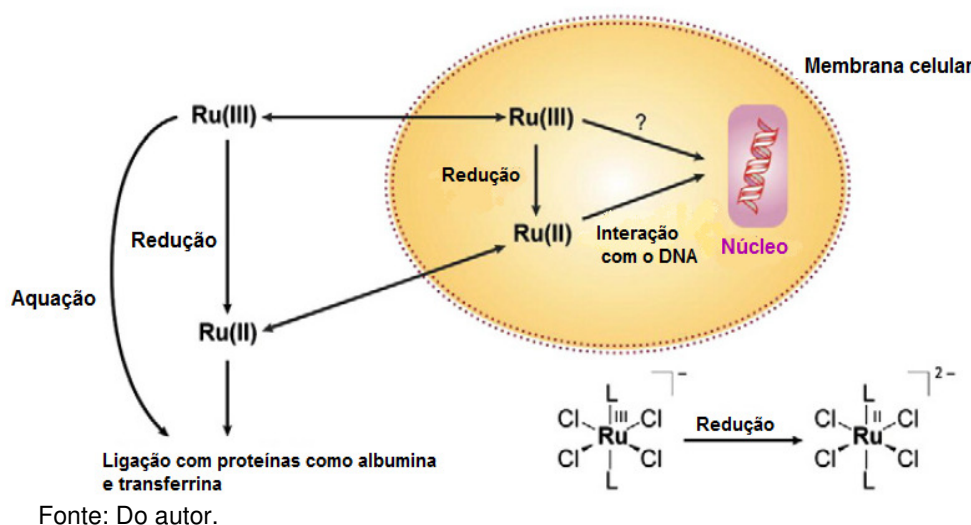
Estudos de estrutura/atividade demonstraram que a atividade biológica do NAMI-A, está relacionada à liberação progressiva de um ou mais ligantes cloretos. Onde acredita-se que o centro metálico de Ru(III) sofre redução pela ação de biomoléculas como albumina e/ou transferrina do plasma sanguíneo, como proposto pela clássica hipótese da “ativação por redução”, (Figura 8) (GRAF; LIPPARD, 2012; FRAUSIN et al., 2005). Dessa forma, postula-se que a atividade antitumoral dos compostos de Ru(III) depende da sua redução para Ru(II), de maneira que o aumento da atividade antimetastática do NAMI-A ocorre na presença das biomoléculas que atuam como redutores biológicos (CLARKE, 2003). Ainda não está totalmente esclarecido se estes compostos exercem sua ação através da interação direta com o DNA. Sabe-se, que a alta toxicidade está relacionada com extensiva danificação ao DNA (MURA et al., 2004; BRABEC; NOVÁKOVÁ, 2006.), e que complexos de Ru(III) que são mais facilmente reduzidos são mais citotóxicos (JAKUPEC et al., 2005).

Figura 7 - Complexos de Rutênio (III) que apresentam atividade antitumoral onde,  
 a)  $\text{Na}\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4\text{Im}(\text{DMSO})]\}$  (NAMI);  
 b)  $[\text{ImH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]\}$  (NAMI-A);  
 c)  $[\text{ImH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})_2]\}$  (ICR);  
 d)  $[\text{IndH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$  (KP1019). Fonte: Do autor.



Fonte: Do autor.

Figura 8 - Vias de redução de compostos de Ru(III), dentro e fora da célula.

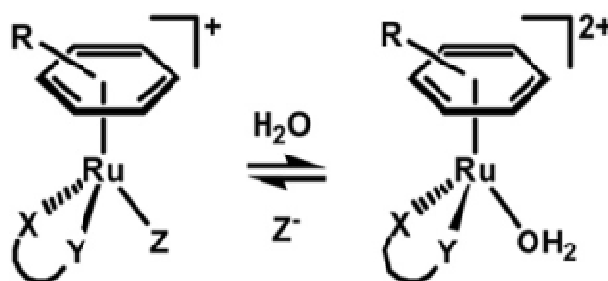


O composto KP1019 também foi investigado quanto às suas interações com o DNA, onde observou-se que o mesmo interage com o DNA de maneira semelhante ao cisplatina, mas com uma intensidade menor em termos de ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína, na ordem de 15 vezes menos que as interações da cisplatina (BERGAMO et al., 2012). Outros autores têm sugerido que o KP1019 sofre ativação *in vivo* por meio da redução de Ru(III) para Ru(II), e que esta redução promove interações com biomoléculas após a aquação da ligação Ru<sup>III</sup>-Cl e alabilização da ligação Ru<sup>II</sup>-Cl (PIZZARRO; SADLER, 2009), permitindo a interação com o DNA que pode ser por intercalação ou por ligação de hidrogênio, induzindo consequentemente a apoptose da célula pelo caminho mitocondrial, gerando citotoxicidade por Espécies Reativas de Oxigênio, estas interações têm sido investigadas e não estão totalmente esclarecidas (BERGAMO et al. 2009; JAKUPEC et al., 2008; KAPITZA et al., 2005). Sendo assim, no que diz respeito às interações biológicas e ao mecanismo de ação investigado por Keppler, o composto KP1019 liga-se a transferrina e apresenta maior efeito citotóxico após a redução de Ru (III) para Ru (II), (Figura 8) (BERGAMO et al. 2009).

Complexos de Ru(II) também têm apresentado potencial atividade anticâncer. Os arenos complexos de Ru(II), compostos de fórmula geral  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$  possuem característica de estrutura “piano stool” (Figura 9), os quais têm sido avaliados quanto às suas propriedades antitumorais. É descrito na literatura que

quando os ligantes Y e Z coordenam como um ligante quelante, ocorre aumento da atividade anticâncer, porém se os ligantes X, Y e Z são ligantes monodentados, a atividade citotóxica contra a linhagem celular A2780 (carcinoma de ovário) não é observada (YAN et al., 2005). Neste caso, o ligante areno  $\eta^6$  atua como um ligante  $\pi$  aceptor, conferindo estabilidade aos arenos complexos no estado de oxidação II. Somado a isso, a presença de um ligante quelante X-Y parece fornecer uma estabilidade adicional para toda a estrutura molecular. O ligante Z é considerado um “grupo abandonador”, tal como um haleto, proporcionando um sítio de coordenação para biomoléculas (Figura 9). Sendo assim, pequenas variações nos ligantes X, Y e Z dos arenos complexos, permitem versatilidade à molécula e a possibilidade de “ajuste fino” em suas propriedades farmacológicas (PIZZARRO; SADLER, 2009).

Figura 9 - Estruturas típicas de arenos complexos de Ru(II) de fórmula geral  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ .



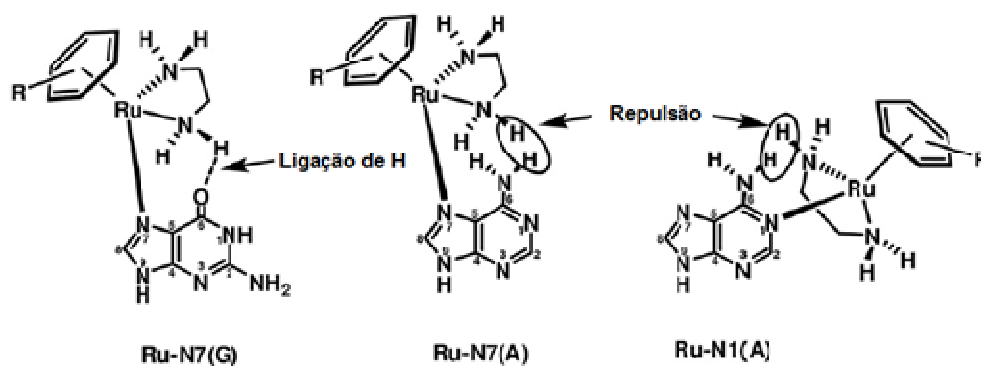
Fonte: PIZZARRO; SADLER (2009).

Outras relações a respeito de estrutura/atividade de areno complexos têm sido estabelecidas. Quando o ligante é etilenodiamina e o grupo abandonador é cloreto, a citotoxicidade em células de câncer de ovário humano (A2780) aumenta proporcionalmente com o aumento do tamanho do areno coordenado. Em geral, areno complexos de Ru(II) mostram potencial atividade contra células tumorais da linhagem A2780. Alguns destes complexos são tão potentes como o cisplatina e o carboplatina (DOUGAN et al., 2006; WANG et al., 2005; AIRD et al., 2002; MORRIS et al., 2001).

Os arenos complexos de Ru(II) tem sido extensivamente investigados quanto às suas interações com o DNA, mas estas interações normalmente apresentam caráter monofuncional, onde a base de coordenação do Ru(II) com a molécula de DNA pode acontecer no N7 da guanina, ou por ligação de hidrogênio entre uma amina se tiver etilenodiamina quelada ao rutênio (LIU et al., 2006), ou por

intercalação no C6O da guanina quando tiver um ligante bifenil ou derivado de antraceno (CHEN et al., 2003) A Figura 10 ilustra a forte ligação existente entre a unidade  $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$  com um dos nitrogênios da base guanina, assim como a interação do H dos  $\text{NH}_2$  do ligante etilenodiamina com o oxigênio da guanina. O mesmo não ocorre com a base adenina, na qual dois grupos  $\text{NH}_2$  se repelem impedindo a aproximação do nitrogênio da base (PIZZARRO; SADLER, 2009; CHEN et al., 2003).

Figura 10 - Interações de hidrogênio que promovem ligação forte da unidade  $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$  à guanina e ligação fraca com adenina.



Fonte: Do autor.

### 3 OBJETIVOS

No presente trabalho o objetivo principal foi o Isolamento e identificação das estruturas moleculares dos constituintes químicos bioativos presentes no extrato bruto de raízes *Caesalpinia var. peltophoroides*. Avaliação do potencial anticâncer e modificação semissintética, com metais de transição (Ru, Pt e V), com a finalidade de otimizar a atividade farmacológica dos compostos isolados, frente ao alvo terapêutico de estudo.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- a) Obtenção do extrato de *Caesalpinia var. peltophoroides* coletadas na cidade de Alfenas-MG;
- b) Isolamento e identificação das estruturas moleculares dos constituintes químicos bioativos presentes no extratos da raiz da planta em estudo, através de métodos cromatográficos, espectroscópicos usuais (RMN, IV e EM);
- c) Modificação semissintética, com metais de transição (Ru, Pt e V), com a finalidade de otimizar a atividade farmacológica dos compostos isolados frente ao alvo terapêutico de estudo;
- d) Caracterização dos mesmos por meio de técnicas de absorção na região do infravermelho e UV/Vis, análise elementar, condutividade, voltametria cíclica e de pulso diferencial e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}^{13}$  e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ;
- e) Obtenção de monocristais e determinação estrutural por meio de difração de raios X, quando possível;
- f) Avaliação do potencial antitumoral do extrato bruto, das substâncias isoladas a partir da planta estudada, e dos compostos modificados.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

No presente trabalho a parte experimental foi descrita em três etapas para melhor compreensão dos procedimentos e técnicas adotadas. A primeira, etapa consiste na descrição dos métodos fitoquímicos empregados envolvendo a extração e isolamento dos compostos da *Caesalpinia var. peltophoroides*. A segunda etapa consiste na descrição dos métodos envolvidos nas sínteses dos complexos metálicos (Pt, V e Ru). A terceira etapa envolve a descrição dos ensaios realizados frente a linhagens tumorais, avaliação do potencial antioxidante e do teor de fenólicos totais.

### 4.1 PARTE EXPERIMENTAL 1

#### 4.1.1 Métodos fitoquímicos empregados

Para a obtenção do extrato bruto e suas respectivas partições, proveniente de raízes da *Caesalpinia var. peltophoroides* foram necessárias algumas etapas.

##### 4.1.1.1 Coleta e identificação:

As raízes da planta foram coletadas na cidade de Alfenas-MG. A extração da planta foi realizada pela prefeitura Municipal, em um processo de rearborização no município, posteriormente depositadas no herbário e identificadas por um profissional capacitado.

A identificação botânica foi realizada na Universidade Federal de Alfenas pelo Professor Dr. Marcelo Polo (Instituto de Ciências da Natureza). A espécie foi catalogada numa exsicata sob o número **UALF-1634** e depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas.

##### 4.1.1.2 Secagem

O material vegetal de raízes foi distribuído de maneira uniforme em bandejas de alumínio da própria estufa. Após o acondicionamento do material vegetal, este foi submetido ao processo de secagem para a retirada de água, o que possibilita um

maior tempo de armazenamento, por evitar a proliferação de microrganismos que possam degradar os constituintes existentes, ocasionando ao erro de posterior análise. A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar por 72 horas em temperatura padrão de 45°C.

#### 4.1.1.3 Trituração

Com o intuito de preparar o material vegetal para a retirada de seus constituintes químicos, realizou-se a trituração para que houvesse uma maior superfície de contato possibilitando o arraste eficaz pelo solvente adotado. Para a trituração foi utilizado moinho de facas onde o maior tamanho de partículas foi de 3 mm, de acordo com as especificações da peneira utilizada.

#### 4.1.1.4 Pesagem

A fim de conhecer o rendimento de extrato a partir da massa de material vegetal, toda massa utilizada foi pesada para o subsequente cálculo do rendimento.

#### 4.1.1.5 Maceração

A maceração é um dos procedimentos empregados para retirar os constituintes químicos existentes em plantas nos estudos fitoquímicos. A técnica adotada faz utilização de EtOH para a solubilização das substâncias presentes. O EtOH possui vasta afinidade e consegue arrastar inúmeras classes de compostos. Foram realizadas quatro macerações, adotadas como padrão, para os constituintes. A solução constituinte/etanol foi concentrada em rota-evaporador, originando o extrato bruto etanólico (E.B.E.) de raiz.

#### 4.1.1.6 Particionamento

O particionamento (líquido-líquido) é uma estratégia muito importante para separar substâncias de mesma polaridade, e tem como função iniciar o trabalho de isolamento dos constituintes químicos e avaliar atividades farmacológicas para os extratos e de suas partições de forma preliminar. Portanto para o extrato de raízes

de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* foi particionado. Os solventes adotados foram hexano, acetato de etila, etanol e butanol como procedimento padrão.

**Metodologia para obtenção das frações hexânica, acetato etílica, butanólica e hidro-alcoólica (partição líquido-líquido).**

A realização da partição líquido-líquido, do extrato bruto etanólico dos constituintes botânicos de *Caesalpinia* var. *peltophoroides* foi realizada com a suspensão em solução EtOH/H<sub>2</sub>O (1:2), transferido para um funil de separação com capacidade adequada para a realização da técnica. Após a suspensão do extrato em EtOH/H<sub>2</sub>O foram adicionados:

- a) Hexano (3X), para a retirada de compostos apolares, característicos dessa fase;
- b) Acetato de Etila (3X), para a retirada de compostos que possuam polaridade intermediária;
- c) Butanol (3X), para a retirada de compostos que possuam polaridade intermediária a elevada;
- d) Concentração da torta remanescente (EtOH/H<sub>2</sub>O), onde compostos de elevada polaridade estarão presentes.

Os volumes padrões de solventes utilizados foram de EtOH:H<sub>2</sub>O (250:500mL), Hexano (400mL) e Acetato de Etila (400mL), em cada uma das 3 repetições, visando o esgotamento das substâncias presentes na fase, que apresentem afinidade ao sistema de partição. Estes valores correspondem a uma partição realizada com 100g de material vegetal. Para maiores valores ou menores valores, o volume aplicado foi proporcional a metodologia adotada. Cada extrato bruto proporcionou três partições que foram codificadas como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Codificação dos constituintes botânicos de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*.

<b>FRAÇÃO</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>SIGNIFICADO DOS CÓDIGOS</b>
HEXANO	ERFHex	EXTRATO DA RAIZ – F. HEXÂNICA
ACETATO	ERFAc	EXTRATO DO RAIZ – F. ACETATO
HIDROALCOÓLICA	ERFET	EXTRATO DA RAIZ – F. HIDROALCOÓLICA
BUTANÓLICA	ERFBUT	EXTRATO DA RAIZ – F. BUTANÓLICA

Fonte: Do autor

#### 4.1.1.7 Liofilização

A liofilização é amplamente aplicada ao tratamento de extratos de plantas, que com a sublimação remove água presente no produto congelado, seja extrato ou substância. A maioria dos extratos de plantas tem em sua constituição substâncias que podem ser convertidas ou degradadas pela ação de temperatura elevada. Uma vez que a análise de constituintes químicos pode ser prejudicada, devido à ausência de conhecimento das propriedades físicas e químicas dos compostos presentes na matriz vegetal foi utilizado o método de liofilização que foi realizado em um liofilizador L101 da Liotop durante 72hs a uma temperatura média de  $-50^{\circ}\text{C}$  e a uma pressão média de  $340\ \mu\text{Hg}$ .

#### 4.1.1.8 Cromatografia em coluna (CC):

Utilizou-se sílica Gel 60 - 70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 3m) ou 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 3m) ASTM da Macherey-Nagel. As especificações da coluna seguem na realização dos experimentos, sendo diferentes para cada caso.

Utilizou-se Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich para a purificação dos compostos isolados.

#### 4.1.1.9 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a realização de CCD, foram utilizadas placas de vidro com 0,25 mm de sílica gel 60 G Merck, com indicador de fluorescência UV-254. O Agrupamento das frações obtidas foi realizado de acordo com o padrão de eluição de cada fração recolhida no procedimento de cromatografia em coluna, após a utilização de reveladores específicos.

#### 4.1.1.10 Solventes para eluição

Para a eluição, tanto em cromatografia em coluna, quanto em cromatografia em camada delgada, com sílica, foram utilizados os solventes Hexano (puro), Hexano/Acetato de Etila (mistura), Acetato de Etila (puro), Acetato de Etila/Metanol (mistura). As proporções de cada coluna são explícitas em cada experimento

separadamente. Para a eluição em Sephadex, utilizou-se apenas Metanol em todos os casos.

#### 4.1.1.11 Reveladores

Como reveladores foram utilizados luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  ou  $365$  nm); Vanilina sulfúrica: solução 1:1 (v/v) de vanilina a 1% em etanol com solução de ácido sulfúrico a 3% (v/v) em água destilada, borrifada na superfície da placa cromatográfica após a eluição e submetida a aquecimento.

#### 4.1.2 Massa de material vegetal e rendimento de partições

Os constituintes botânicos de *Caesalpinia var. peltophoroides*, coletadas na cidade de Alfenas-MG, foram submetidos à maceração em EtOH. A massa referente aos extratos etanólicos (EBE) e suas respectivas partições obtidos de raízes estão representados na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2 - Rendimento para extrato bruto de *Caesalpinia var. peltophoroides*

CONSTITUINTE	MATERIAL VEGETAL (g)	E.B.E (g)	RENDIMENTO (%)
RAIZ	2313	233,2	10,08

Fonte: Do autor.

Tabela 3 - Rendimentos para partições obtidas das partições de *Caesalpinia var. peltophoroides*

CONSTITUINTE	E.B.E.	PARTIÇÕES (g)	RENDIMENTO (%)
RAIZ	233,2g		
HEXÂNICA		15	6,43
ACETATO		88,8	38,07
BUTÁNOLICA		57	24,03
HIDRO		71	30,00
ALCOÓLICA			

Fonte: Do autor.

### 4.1.3 Isolamento do ácido gálico e galato de propila

Após o fracionamento do extrato bruto de raízes de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*, uma massa de 20g da fração acetato de etila (EBRAc) foi submetida ao processo de cromatografia em coluna para isolamento dos seus constituintes. Todas as alíquotas recolhidas foram concentradas em um evaporador rotativo com pressão reduzida e temperatura de 45°C. E o processo foi acompanhado por cromatografia em camada delgada analisada em câmara de UV de  $\lambda = 254$  e 365 nm para o agrupamento das frações obtidas.

#### 4.1.3.1 Coluna da fração acetato de raízes de *Caesalpinia* var. *peltophodoires* (CERFAc)

Dados Gerais utilizados no processo de cromatografia em coluna.

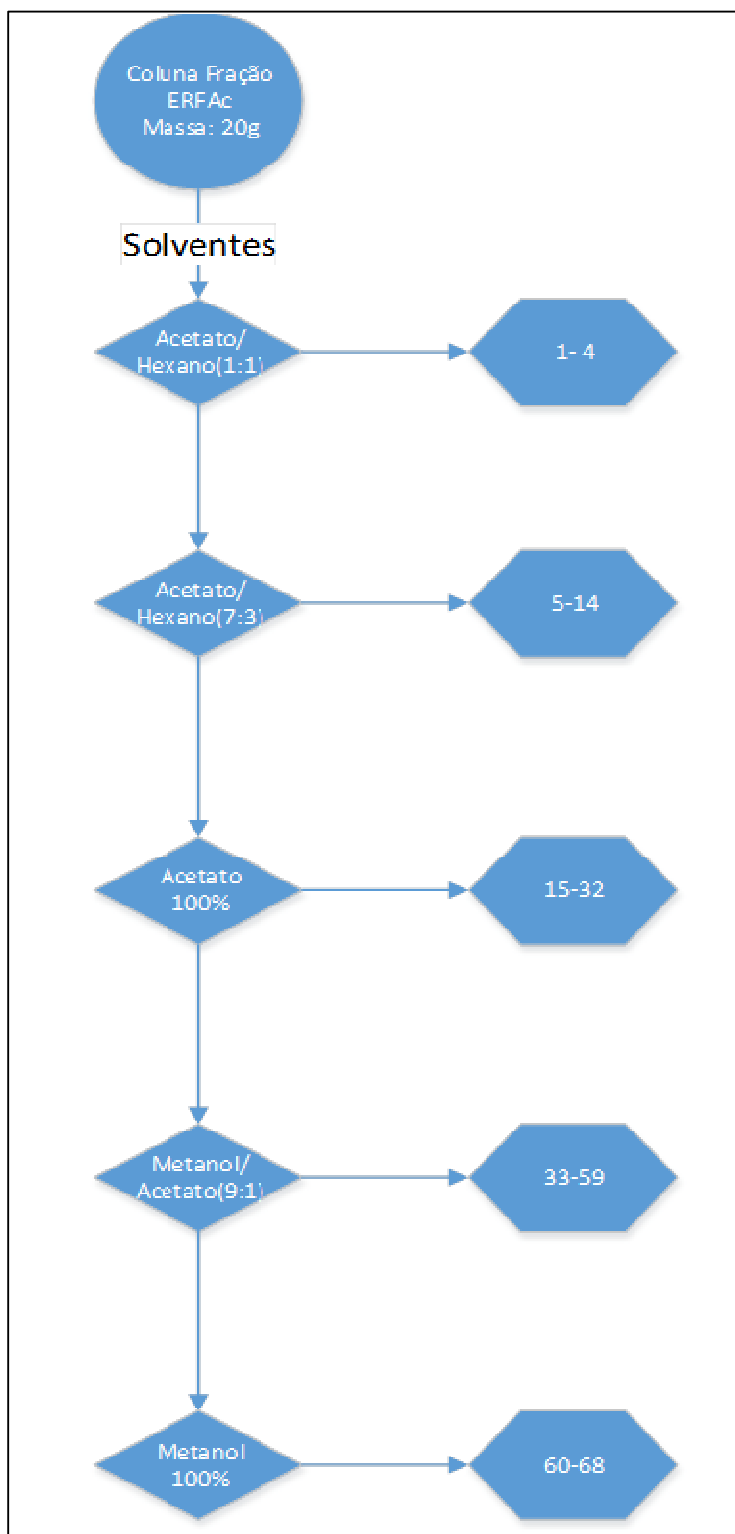
- Massa de Amostra: 20g
- Sílica Gel: 129g
- Diâmetro da Coluna: 11,5cm
- Altura de Sílica: 26,5cm
- Início: Hexano 100%
- Frações: 250mL

A coluna foi eluída com misturas de hexano; acetato e metanol com gradiente crescente de polaridade. As misturas utilizadas estão citadas abaixo.

- Solventes e proporções:
- Hexano 100%
- Hexano/Acetato – 1:1
- Acetato 100%
- Acetato/Metanol – 9:1
- Metanol 100%

Na Figura 11 é demonstrado o fluxograma das etapas do processo de cromatográfico em coluna para a fração acetato proveniente do extrato bruto de raízes de *Caesalpinia* var. *peltophoroides* (CERFAc), com os solventes adotados e suas proporções.

Figura 11 - Fluxograma demonstrando as etapas do processo de cromatografia em coluna para a fração acetato proveniente do extrato bruto de raízes de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*



Fonte: Do autor

Do processo cromatográfico descrito acima na Figura 11, as seguintes frações foram agrupadas:

- 1-10
- 11-14
- 16-20
- 21-23
- 24-26
- 27-34
- 35-38
- 39-44
- 45-51
- 52-68

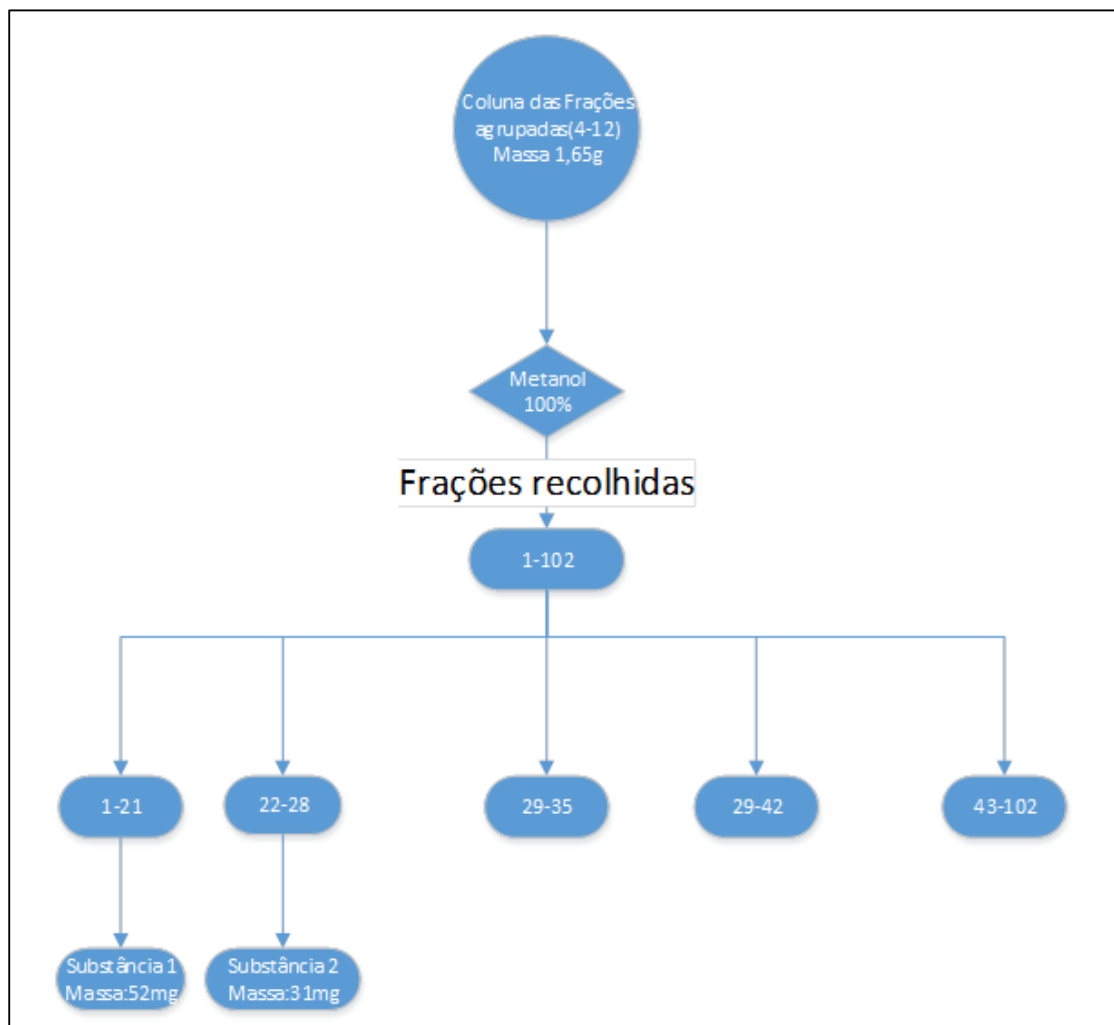
Dentre as frações agrupadas, a fração que se mostrou mais promissora e como uma massa considerável (420mg) foi à fração de 1-10, que apresentou apenas cinco manchas na cromatografia em camada delgada. Essa fração foi submetida a uma etapa de purificação em coluna de Sephadex (Figura 12).

#### 4.1.3.2 Coluna da fração 1-10 recolhida da partição acetato de raízes de *Caesalpinia* var. *peltophodoires*

Dados Gerais utilizados no processo de cromatografia em coluna.

- Massa de Amostra: 420mg
- Sephadex: 100g
- Diâmetro da Coluna: 9,5cm
- Altura de Sephadex: 32cm
- Solvente: Metanol
- Frações: 10mL

Figura 12 - Fluxograma demonstrando a obtenção da substância 1 e 2 proveniente do extrato bruto de raízes de *Caesalpinia* var. *peltophoroides* (CERFAC 1-21; 22-22) em Sephadex.



Fonte: Do autor.

## 4.2 PARTE EXPERIMENTAL II

### 4.2.1 Síntese dos complexos

#### 4.2.1.1 Atmosfera de argônio

As preparações dos complexos foram feitas sob atmosfera de argônio, o qual foi tratado por um sistema de colunas contendo: sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador do tipo BTS-R-11.9 (Fluka Chemika), sendo que a última foi mantida a 60°C para o catalisador permanecer ativado.

Estes procedimentos são necessários para desoxigenar e secar o gás comercial de procedência White Martins ou Aga.

#### 4.2.1.2 Solventes

Todos os solventes passaram por processos de purificação segundo os métodos usuais da literatura. Os principais solventes utilizados foram: acetona, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, metanol e hexano.

#### 4.2.1.3 Reagentes químicos

Utilizou-se tricloreto de rutênio hidratado ( $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), acetilacetato de vanádio IV [ $\text{VO}(\text{acac})_2$ ], platina, trifenilfosfina, 1,4-bis(difenilfosfina)butano e perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) de procedência Aldrich.

### 4.2.2 Instrumentação

#### 4.2.2.1 Microanálise

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos compostos sintetizados foram realizadas em um analisador CHN modelo EA 1108 da FISOONS, no laboratório de microanálise do Departamento de Química da UFSCar.

#### 4.2.2.2 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram obtidos em nosso laboratório utilizando-se um espectrofotômetro BOMEM MICHELSON FT MB-102, na região compreendida entre 4000 e 200  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando-se a técnica de pastilha e com as amostras sendo diluídas em KBr (Merck P.A.). Este foi mantido em estufa a 120 °C e previamente triturado antes de ser utilizado.

#### 4.2.2.3 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Os espectros eletrônicos foram obtidos em nosso laboratório utilizando-se um espectrofotômetro UV/Vis-NIR-Varian-Cary 500. Os compostos foram preparados em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de modo a se obter soluções de concentração da ordem de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L. As medidas foram feitas em cubetas com caminho óptico de 1 cm na faixa de 200 a 800 nm. Os máximos de absorção e os valores de absortividades molares foram determinados diretamente dos espectros.

#### 4.2.2.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ $\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}$ $\{^1\text{H}\}$

Os espectros de Ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz e/ou ARX 200 MHz pertencentes ao Departamento de Química da UFSCar.

Para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  utilizou-se o solvente  $\text{CDCl}_3$  e os deslocamentos químicos foram determinados em relação ao tetrametilsilano (TMS). Para as amostras de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  utilizou-se solventes não deuterados, com um capilar (45 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro interno) contendo  $\text{D}_2\text{O}$ .

#### 4.2.2.5 Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial

Os voltamogramas cíclicos e voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos empregando-se um potenciostato BAS-100B. Fez-se as medidas em uma célula eletroquímica de vidro, com capacidade para 3 mL, confeccionada na oficina de vidraria do departamento de Química da UFSCar. Utilizaram-se três eletrodos: um de referência Ag/AgCl em solução 0,1 mol/L de PTBA em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mantido no interior de um capilar de Luggin-Haber; e os eletrodos de trabalho e auxiliar constituídos de tarugos de platina. As soluções eletrolíticas (PTBA - 0,1 mol/L em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) foram preparadas de modo a se obter concentrações da ordem de  $1 \times 10^{-3}$  mol/L.

#### 4.2.2.6 Condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram realizadas utilizando um condutivímetro MICRONAL modelo B-330 equipado com cela de platina com constante igual a  $0,089 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando-se as soluções com concentrações iguais a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  em acetona.

#### 4.2.3 Síntese dos complexos de precursores

Os precursores [*mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{H}_2\text{O})]$ ],  $[\text{VO}(\text{acac})_2]$  e  $[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$  utilizados na coordenação do galato de propila, são compostos já descritos na literatura (BARBOSA, 2007). Estes são utilizados e foram desenvolvidos no laboratório LERCI- UFSCar, onde as sínteses foram realizadas.

##### 4.2.3.1 $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$

O complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  foi sintetizado da seguinte maneira: em um balão de duas bocas contendo 20 mL de metanol previamente deaerado e 20  $\mu\text{L}$  de trietilamina dissolveu-se 0,05 g do GP ( $2,3 \times 10^{-4} \text{ mmol}$ ). Em seguida foram adicionados 0,100 g ( $1,5 \times 10^{-4} \text{ mmol}$ ) do precursor  $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{H}_2\text{O})]$ . A reação permaneceu em agitação por duas horas. Após este período o composto foi rotaevaporado até aproximadamente 1 mL, e em seguida 15 mL de água previamente deaerada foram adicionados promovendo a precipitação de um sólido azul intenso. O composto obtido foi seco em dessecador. A massa pesada foi 0,103 g e o rendimento foi de 83,0 %.

##### 4.2.3.2 $[\text{VO}(\text{GP})_2]$

O complexo  $[\text{VO}(\text{GP})_2]$  foi sintetizado da seguinte maneira: em um balão de duas bocas submetido à atmosfera inerte de argônio, contendo 20 mL de metanol previamente deaerado dissolveu-se 0,05 g do GP ( $2,3 \times 10^{-4} \text{ mmol}$ ). Em seguida foram adicionados 0,100 g ( $3,8 \times 10^{-4} \text{ mmol}$ ) do precursor  $[\text{VO}(\text{acac})_2]$ . A reação

permaneceu em agitação por 30 minutos. Após este período o composto foi rotaevaporado até completa secagem. O composto apresentou coloração azul intensa. O composto obtido foi seco em dessecador, a massa pesada foi 0,345 g e o rendimento foi de 94,7%.

#### 4.2.3.3 [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

O complexo [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] foi sintetizado da seguinte maneira: em um balão de duas bocas contendo 20 mL - 1:1 (metanol / diclorometano) previamente deaerados, dissolveu-se 0,022 g do GP ( $1,0 \times 10^{-4}$  mmol). Em seguida foram adicionados 0,08 g ( $1,2 \times 10^{-4}$  mmol) do precursor [Pt(Cl)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. A reação permaneceu em agitação por 24 horas, em aquecimento. Após este período o composto foi rotaevaporado até aproximadamente 1 mL e em seguida 15 mL de água previamente deaerada foi adicionada promovendo a precipitação de um sólido amarelo. O composto obtido foi seco em dessecador. A massa pesada foi 0,020 g e o rendimento foi de 22,2 %.

### 4.3 PARTE EXPERIMENTAL III

Como mencionado acima, a terceira etapa envolve a descrição dos ensaios biológicos como: avaliação do potencial antioxidante e do teor de fenólicos totais do extrato bruto de raízes de *Caesalpinia var. peltophoroides*, avaliação antitumoral do biflavonóide 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona.

Avaliação antitumoral dos complexos [Ru(GP)(dppb)(Cl)], [VO(GP)<sub>2</sub>] e [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].

#### **4.3.1. Determinação da atividade antioxidante e fenólicos totais do extrato bruto de *Caesalpinia var. peltophoroides***

#### 4.3.1.1 Determinação da atividade antioxidante

Com intuito de avaliar o poder antioxidante dos constituintes de *Caesalpinia* var. *peltophoroides* foram realizados os testes antioxidantes por DPPH<sup>•</sup> e fenólicos totais para mensurar, respectivamente a atividade sequestrante de radicais DPPH<sup>•</sup> e quantificar os compostos fenólicos existentes em cada constituinte da planta.

##### 4.3.1.1.1 Teste DPPH<sup>•</sup>

O teste antioxidante por DPPH<sup>•</sup> é utilizado para demonstrar a atividade sequestrante de radicais livres (ASRL) através da estabilização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. Quando este radical é neutralizado por um agente antioxidante, sua absorvância natural em  $\lambda=517\text{nm}$  sofre decréscimo em função do aumento da ASRL da amostra, podendo se transformar em uma solução violeta-claro a amarela, indicando a estabilização total do radical. A quantidade de DPPH<sup>•</sup> removida do meio, acompanhada pela diminuição na absorvância da solução do radical, é proporcional à atividade sequestrante (scavenging) da amostra, sendo possível, portanto, assumir que o consumo de DPPH<sup>•</sup> é equivalente à capacidade antioxidante pelas substâncias presentes na amostra (ESPIN, et al., 2000).

#### ✓ Metodologia para o teste DPPH<sup>•</sup> e preparação das amostras

O teste foi realizado segundo a metodologia de Yen (2005), com algumas modificações. A faixa de concentração média adotada abrange 12,5 ppm até 100 ppm. Para evitar degradação do radical DPPH<sup>•</sup>, o teste foi realizado em tubos de ensaio envoltos por papel alumínio, tampados e devidamente etiquetados com os códigos das partições e as concentrações trabalhadas. As amostras foram preparadas a partir de cinco miligramas solubilizadas em 50 mL de EtOH, gerando uma solução mãe de 100 ppm para cada partição. Diluições foram realizadas para obter concentrações de 50 ppm, 25 ppm e 12,5 ppm. Em seguida, foram pipetados 4 mL de cada uma das soluções padrões aos tubos de ensaio e 1 mL da solução 0,5 mmol/L de DPPH<sup>•</sup>, em triplicata, aguardando-se trinta minutos para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Após a leitura, os dados

foram tratados matematicamente, onde a média da absorbância foi tratada com a fórmula, resultando na porcentagem de neutralização de radicais livres.

✓ **Preparação do (2,2-difenil-1-picril hidrazil) DPPH\***

O DPPH\* é um radical fotossensível, portanto, foi preparado em béquer isolado tendo seu volume acertado em balão volumétrico na concentração de 0,5 mmol/L. Uma solução de 100 mL foi preparada para a realização do teste, onde a massa de 20 mg de DPPH\* foi utilizada.

✓ **Preparação dos padrões antioxidantes adotados para o teste**

Os padrões para comparação da atividade antioxidante dos constituintes de *Caesalpinia var. peltophoroides* foram Ácido Ascórbico (AA) e Butil-Hidróxi Tolueno (BHT), preparados com 5mg de cada, gerando a solução mãe em EtOH de 100 ppm, também diluídas para produzir soluções de 50, 25 e 12,5 ppm.

✓ **Cálculo da atividade antioxidante dos constituintes de *Caesalpinia var. peltophoroides*:**

A equação utilizada para o cálculo da atividade antioxidante foi:

$$\% \text{ Atividade A. oxidante} = \frac{\text{Absorbância (Branco)} - \text{Absorbância (Amostra)}}{\text{Absorbância (Branco)}} * 100$$

Mostrando os resultados em % de atividade antioxidante, comparada aos padrões adotados e ao branco, que foi preparado em triplicata com todos os componentes menos as amostras das partições e padrões.

✓ **Preparação das amostras para o teste**

As soluções das partições hexano, acetato de etila e hidroalcoólica foram preparadas na mesma faixa de concentração adotada para o DPPH\*, pesando-se 5 mg de amostra, solubilizados em 50 mL de EtOH, produzindo uma solução mãe de 100 ppm, sendo diluída para a formação das demais, assim como para os padrões AA e BHT.

#### 4.3.1.1.2 Determinação dos fenólicos totais

O teste adotado para Fenólicos Totais consiste na redução do Molibdênio e Tungstênio do reagente Folin-Ciocalteu com números de oxidação +6 para +5, quantificando em equivalentes de ácido gálico, a concentração total de compostos fenólicos nos extratos trabalhados. Os ácidos do reagente Folin-Ciocalteu apresentam coloração amarela, passando a absorver no comprimento de onda de  $\lambda=750\text{nm}$ , apresentando uma coloração azulada quando reduzidos. Quanto maior a absorvância neste comprimento de onda, maior a concentração de compostos fenólicos capazes de reduzir os metais.

**Metodologia para o teste Fenólicos Totais:** Segundo a metodologia adotada, descrita por SOUZA et al. (2007), com algumas modificações, seguiu-se os seguintes passos: a) 7,5 mg da amostra foram solubilizados em MeOH, tendo seu volume acertado para 50 mL, produzindo uma solução mãe de 0,15 mg/mL; b) a uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução mãe foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água; c) após 1 minuto, adiciona-se 2mL da solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; d) após 30 segundos, ajusta-se o volume da solução para 10mL; e) A solução deve permanecer em repouso por 2 horas tendo sua leitura realizada em  $\lambda=750\text{nm}$ . Foram utilizadas cubetas de acrílico.

#### 4.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral

##### 4.3.2.1 Linhagens celulares e condições de cultura

Foram utilizadas nesses estudos seis linhagens de células tumorais: carcinoma do pulmão humano (A549), carcinoma da mama humano (MCF-7 e Hs578T), carcinoma hepatocelular de camundongo (HTC), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e Glioma humano (U251). As culturas de células foram mantidas em DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium Mínimo Essencial, Sigma, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil). As células foram cultivadas em 37°C incubadora umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

##### 4.3.2.2 Ensaio de viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS)

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $5 \times 10^3$  ou  $1 \times 10^4$  células/poço dependendo a linhagem celular considerada. As células foram tratadas por 48h com os diferentes compostos em concentrações que variaram de 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ . A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico (MTS) usando o *Kit CellTiter 96@Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega). O método baseia-se na conversão, via desidrogenases, do sal [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboximetoxifenil) -2 - (4-sulfofenil-2H-tetrazólio)] em formazano, um composto solúvel em meio aquoso que absorve luz a 490 nm (CORY et al., 1991). A quantidade de formazano produzida é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Os valores de absorbância de amostras tratadas foram comparados com os valores de absorbância obtidos nas amostras controles. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os resultados apresentados são correspondentes a média  $\pm$  desvio padrão. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram obtidos a partir de curvas de regressão usando o Software GraphPad®. A cisplatina, um medicamento altamente citotóxico, utilizada em quimioterapia foi utilizada como controle positivo.

#### 4.3.2.3 Análise do ciclo celular

Após o tratamento, as células foram colhidas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBSA) e fixadas em 70% de metanol a 4 °C durante a noite. Após a lavagem (duas vezes) com PBSA frio, as células foram suspensas em solução de corante [PBSA contendo 30  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de iodeto de propídio (PI) e 3 mg / mL de ARNase]. DNA foi quantificado usando um citômetro de fluxo (Guava easyCyte, Millipore) após 1 h de coloração. Os dados mostraram que são representativos de três experimentos independentes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem inicial do extrato bruto e de suas respectivas partições

#### 5.1.1 Avaliação da atividade antioxidante

Inicialmente foi realizado o teste antioxidante com o extrato bruto da raiz da *Caesalpinia var. peltophoroides*, onde resultados significantes quanto a porcentagem de ASRL comparados aos padrões AA e BHT foram observados. Tendo conhecimento dessa atividade, os testes em suas respectivas partições foram realizados. Dentre as partições analisadas, foi possível observar que a de acetato e butanólica mostraram-se ativas em menores concentrações quando comparadas aos padrões AA e BHT, apresentando os menores valores de absorbância em 517 nm, tal fato, indica uma maior neutralização do radical DPPH<sup>•</sup>, em contraste com a partição hexânica, como pode ser observado na

Tabela 4.

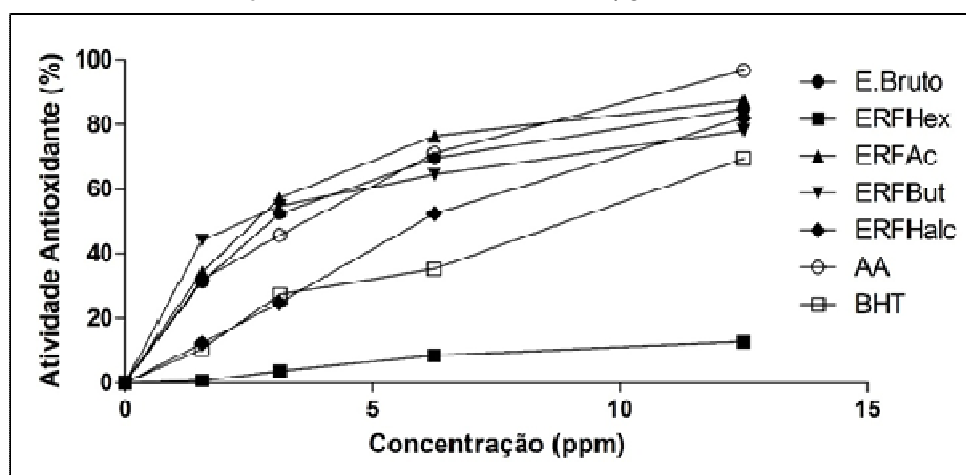
Tabela 4 - Dados de absorbância obtidos através da leitura em 517nm da avaliação sequestrante de radicais DPPH<sup>•</sup> dos extrato bruto de *Caesalpinia var. peltophoroides*, e suas respectivas partições e dos padrões AA e BHT.

<b>Concentração (ppm)</b>	<b>1,56</b>	<b>3,125</b>	<b>6,25</b>	<b>12,5</b>
ERBRUTO	31.321±1,66	52.381±0,51	69.517±0,86	84.943±1,81
ERFHEX	0.7380,35	3.588±0,58	8.551±0,80	12.676±0,88
ERAC	34.272±0,91	57.210±0,45	76.459±0,60	87.458±0,55
ERFBUT	44.199±1,26	54.795±0,65	64.487±0,76	78.169±0,70
ERFET	12.240±0,68	24.782±1,64	52.381±1,54	82.126±0,38
AA	31.891±4,77	45.708±3,68	71,060±1,23	96.814±0,82
BHT	10.463±3,33	27.297±5,10	35.312±2,04	69.484±1,02

Fonte: Do autor.

Os resultados apresentados nos gráficos a seguir (Figura 13) são interpretados de acordo com a porcentagem de inibição de radicais DPPH<sup>•</sup> em solução, de acordo com a fórmula supracitada.

Figura 13 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH• dos extratos bruto da raiz de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*, e suas respectivas partições nas concentrações de 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 µg/mL no teste de antioxidante.



Fonte: Do autor.

Os valores de  $IC_{50}$  foram obtidos pela regressão não linear dos dados de cada fração, admitindo os valores oriundos da equação de reta para cada caso, onde o eixo “y” representa a atividade (%) e o eixo “x” representa a concentração (µg/mL). Os valores de  $IC_{50}$  obtidos são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) do extrato bruto *Caesalpinia* var. *peltophoroides* e de suas respectivas partições, pelo teste antioxidante por DPPH•, obtidos por regressão não linear, com os respectivos desvios padrões.

Amostras	Valor de $IC_{50}$ µg/mL
Extrato Bruto	3,045± 0,033
ERFHex	1483,560± 140,561
ERFAc	1,840± 0,595
ERFBu	2,582± 0,036
ERFHal	5,441± 0,086
AA	1,814± 0,47
BHT	7,096± 0,606

Fonte: Do autor.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 5 é possível estabelecer que a atividade sequestrante de radicais livres das frações ERAc e ERFBu é elevada, pois apresentaram valores de  $IC_{50}$  próximos ao padrão AA, tornando interessante o

isolamento dos constituintes existentes nessas frações e a posterior realização dos testes farmacológicos onde a atividade antioxidante seja essencial no combate aos radicais livres gerados nos processos bioquímicos.

### 5.1.2 Determinação da porcentagem de compostos fenólicos

O teste se baseia na interpolação dos resultados de leitura em UV-vis, obtidos experimentalmente das amostras a serem quantificadas com a curva analítica do ácido gálico, adquirida experimentalmente, que fornece a equação da reta para o cálculo (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultado de Absorbância em 750nm para as soluções formadoras da curva analítica do ácido gálico, nas concentrações de 0 até 200 µg/mL.

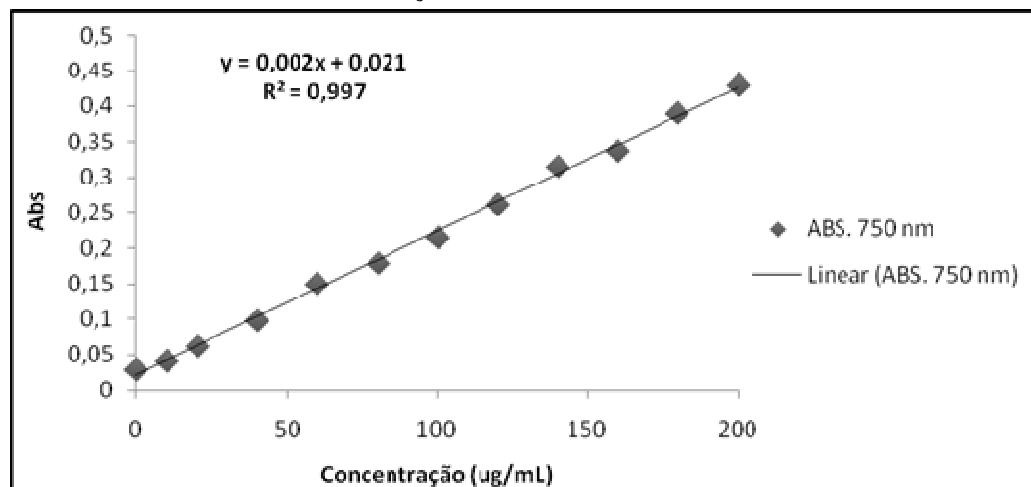
(CONC. ug/mL)	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	MÉDIA
0	0,03	0,029	0,03	0,030
10	0,041	0,041	0,041	0,041
20	0,062	0,061	0,062	0,062
40	0,097	0,097	0,097	0,097
60	0,141	0,152	0,16	0,151
80	0,18	0,175	0,185	0,180
100	0,215	0,214	0,215	0,215
120	0,262	0,259	0,261	0,261
140	0,318	0,31	0,317	0,315
160	0,329	0,333	0,353	0,338

Fonte: do autor.

### Curva analítica do Ácido Gálico

A curva de calibração foi elaborada com 12 pontos de 0 até 200 µg/mL, em triplicatas, tendo como resultado um coeficiente de determinação de  $R^2=0,9978$ . A equação da curva de calibração foi  $A = 0,002C + 0,0218$ , onde A é a absorbância e C, a concentração de ácido gálico (Figura 14).

Figura 14 - Curva analítica obtida após a plotagem dos dados de absorvância das soluções padrões de ácido gálico nas respectivas concentrações para a obtenção do coeficiente de determinação.



Fonte: Do autor.

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama são apresentados na Tabela 7. O extrato bruto e suas respectivas partições de raízes *Caesalpinia* var. *peltophoroides* é rica em compostos fenólicos, mostrando concentrações significativas, presentes assim como descrito para outras representantes da família (ZAMBLÉ et al., 2008; JUN, et al., 2008).

A fração acetato de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*, apresentaram uma maior concentração de compostos fenólicos, em relação as frações hidroalcoólica, butanólica e hexânica, que cujo a última apresentou a menor concentração devido a característica apolar do solvente (MILANI et al. 2012).

A maior concentração de compostos fenólicos na fração acetato justifica o menor valor do  $IC_{50}$  encontrado no teste de ASRL, uma vez que os compostos fenólicos são conhecidos na literatura por apresentar uma potente atividade antioxidante (SOARES, 2002).

Tabela 7 - Valores de Absorbância resultante em 750 nm para o teste FENÓLICOS TOTAIS e Porcentagem de compostos fenólicos para o extrato de *Caesalpinia var. peltophoroides* e suas respectivas partições. Resultado apresentado em equivalentes de ácido gálico.

EXTRATOS	1	2	3	MÉDIA	RESULT.	mg/g	%	DESVIO
Hexano	0,098	0,097	0,095	0,123	37,433	338,444	33,844	0,001
Acetato	0,191	0,191	0,191	0,191	84,600	564,000	56,400	0,000
Butanólica	0,15	0,149	0,148	0,149	63,600	424,000	42,400	0,001
Hidroalcoólica	0,142	0,137	0,137	0,139	58,433	389,556	38,956	0,003
Extrato Bruto	0,174	0,174	0,175	0,174	76,267	508,444	50,844	0,001

Fonte: Do autor.

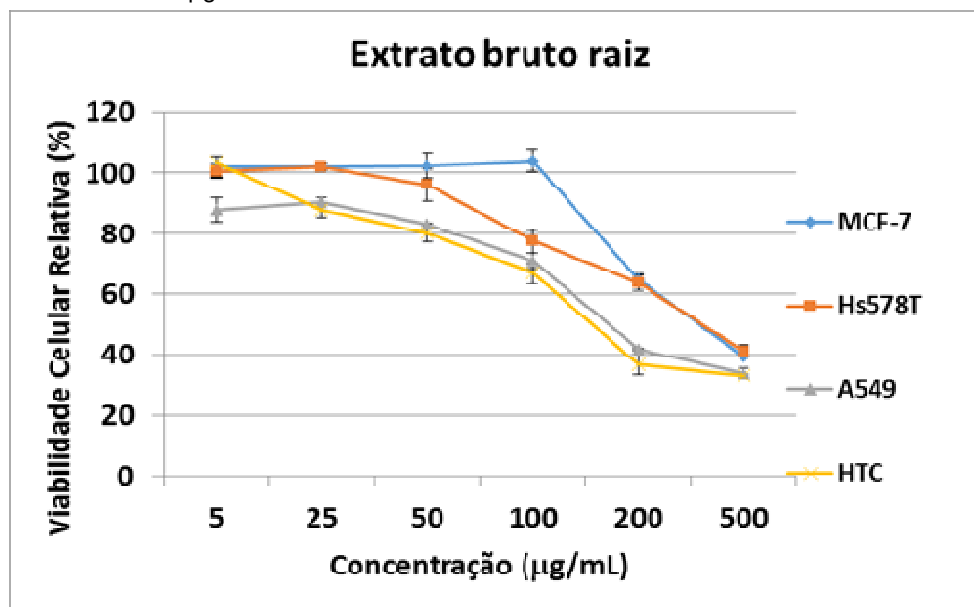
### 5.1.3 Atividade antitumoral

#### 5.1.3.1 Viabilidade celular

##### 5.1.3.1.1 Viabilidade celular do extrato bruto de raízes de *Caesalpinia Petophoroides* determinada por ensaio colorimétrico (MTS)

Os resultados mostraram que o extrato bruto de raízes de *Caesalpinia* (EBRC) foi eficaz na redução da viabilidade das células de forma dependente da concentração em todas as linhagens celulares estudadas (HTC, MCF7, Hs578T e A549). A Figura 15 mostra a redução drástica da viabilidade celular em culturas tratadas com EBRC em concentrações superiores a 100  $\mu$ M. Dentre as linhagens celulares estudadas a hepatocarcinoma (HTC) e de câncer de pulmão (A549) foram as que apresentaram uma maior capacidade de resposta ao tratamento. Os resultados indicaram que EBRC tem uma potencial atividade anti-proliferativa em células HTC e A549.

Figura 15 - Viabilidade celular em culturas tratadas com EBRC em concentrações de 5 a 200 µg/L.

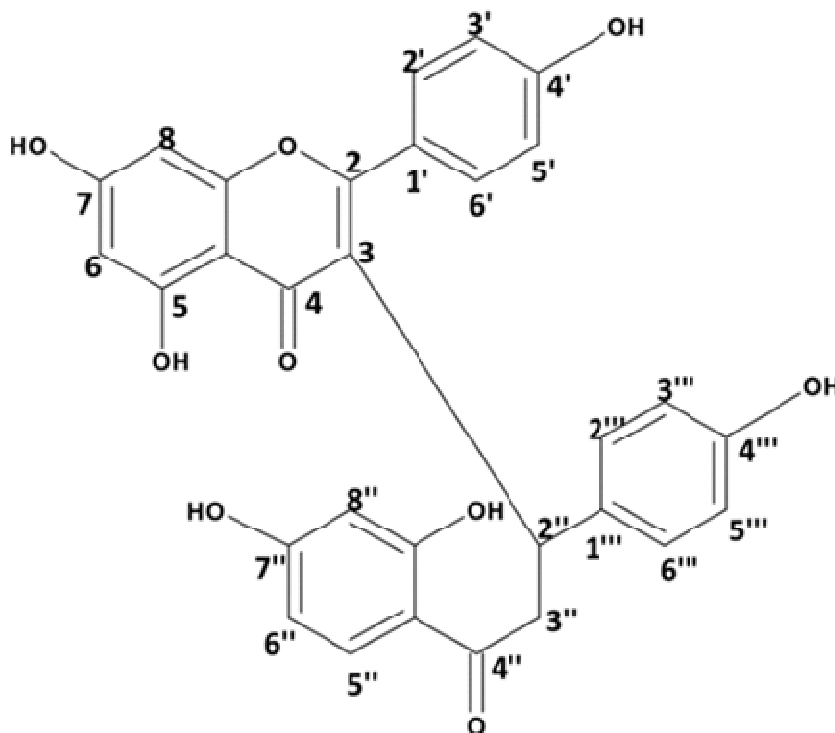


Fonte: Do autor.

#### 5.1.3.1.2 Viabilidade celular do biflavonóide, determinada por ensaio colorimétrico (MTS)

Para o composto (Figura 16) isolado do caule de *Caesalpinia* var. *peltophoroides* por ZANIN 2012, foram realizados testes de atividades antiproliferativas/citotóxico, em quatro linhagem de células de tumor (carcinoma do pulmão humano (A549), carcinoma da mama humano (MCF-7 e Hs578T) e carcinoma hepatocelular de camundongo (HTC), a fim de conhecer a atividade antitumoral do composto, uma vez que este composto também se encontra presente nas raízes de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*.

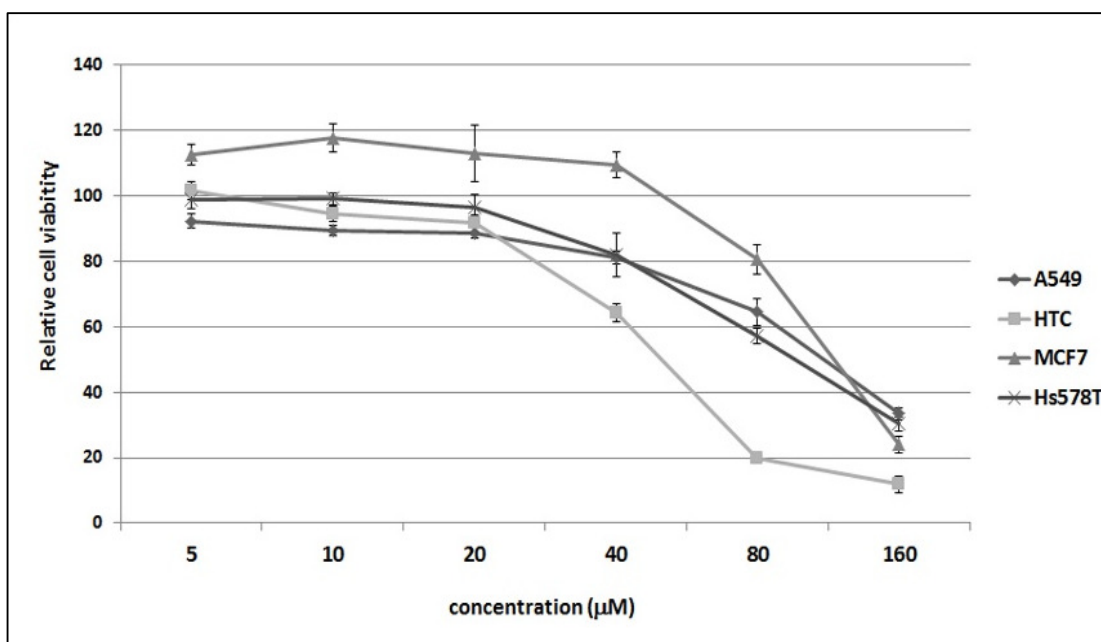
Figura 16 - Estrutura Química da substância 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona, isolada do caule de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*,



Fonte: ZANIN (2012).

Os resultados mostraram que a biflavonóide foi eficaz na redução da viabilidade das células de uma forma dependente da concentração em todas as linhas celulares estudadas (HTC, MCF7, Hs578T e A549). A Figura 17 mostra a redução drástica da viabilidade celular em culturas tratadas com Caesalpinioflavona em concentrações superiores a 40  $\mu\text{M}$ . Dentre as linhagens celulares estudadas a Linhagem de células de hepatocarcinoma (HTC) foi a que apresentou maior capacidade de resposta ao tratamento (valor de  $\text{IC}_{50} = 48 \pm 1,60 \mu\text{M}$ ). Quando as células de HTC foram tratadas sob as mesmas condições, com o cisplatina, um potente agente anticâncer, o valor de  $\text{IC}_{50}$  encontrado foi de  $32,53 \pm 1,49 \mu\text{M}$ . Os resultados indicam que Caesalpinioflavona tem uma potencial atividade anti-proliferativa em células HTC. Nos últimos anos foram relatados que diferentes flavonóides exercem a inibição do crescimento e / ou atividade citotóxica em linhas de células de carcinoma hepatocelular (LIANG et al, 2012;. YANG et al, 2011).

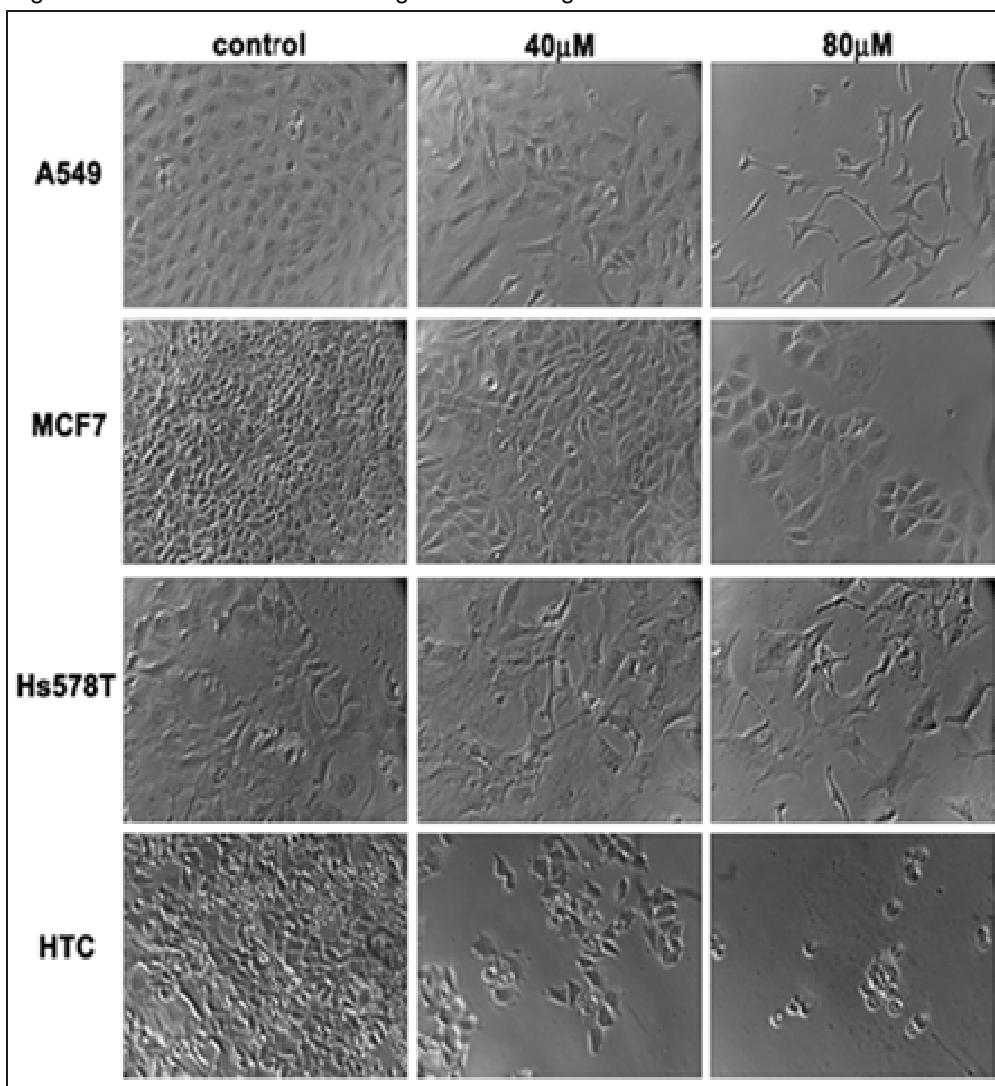
Figura 17 - Viabilidade celular em culturas tratadas com Caesalpinioflavona em concentrações superiores 40  $\mu\text{M}$ .



Fonte: Do autor.

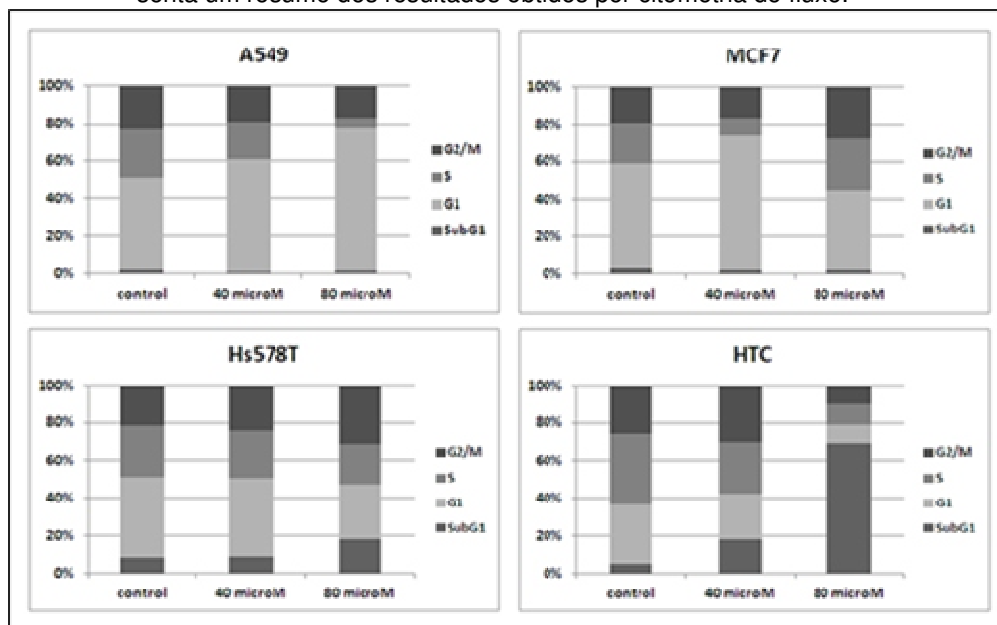
As imagens obtidas por microscopia de contraste de fase (Figura 18) mostram as características morfológicas das linhagens celulares estudadas. As imagens evidenciam claramente menor densidade celular do que em culturas tratadas com culturas de controle. Resultados semelhantes foram obtidos por YOU et al. (2013). Por fim, foi realizada a análise do ciclo celular para investigar se este evento é conseqüente de indução de morte celular ou a parada do ciclo celular. Assim, as culturas foram tratadas com o biflavonóide a 40  $\mu\text{M}$  e 80  $\mu\text{M}$  e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que os efeitos do biflavonoide sobre a progressão do ciclo celular é uma forma dependente da concentração e é ainda varia dependendo do tipo de célula considerado (Figura 19).

Figura 18 - Características morfológicas das linhagens celulares estudadas.



Fonte: Do autor.

Figura 19 - Análise do ciclo celular de linhagens de células tumorais tratadas por 48h com biflavonóide em uma concentração de 40 $\mu$ M e 80  $\mu$ M. A Figura representa um resumo dos resultados obtidos por citometria de fluxo.



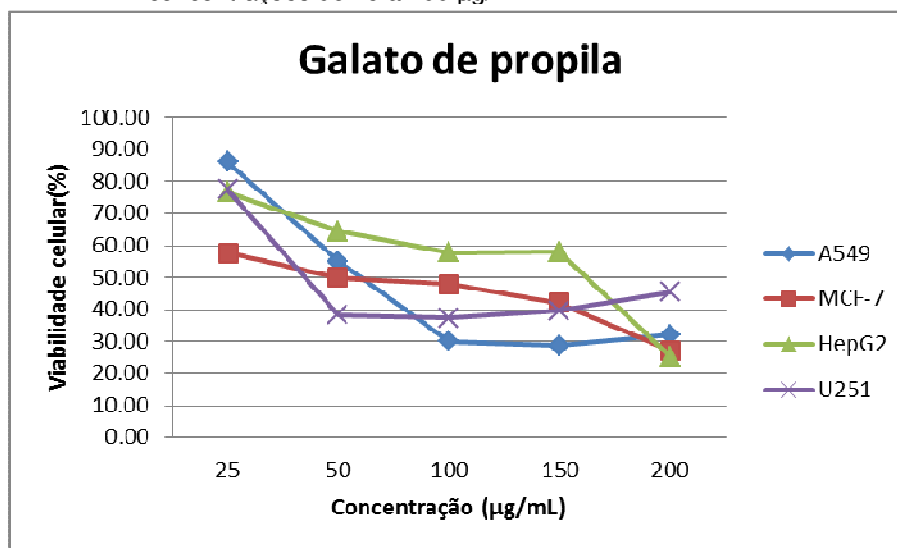
Fonte: Do autor.

Na linhagem MCF7 foi possível observar a paralização do ciclo celular em transição G1/L (a 40  $\mu$ M) e G2/M (a 80  $\mu$ M). Na A549, ambas as concentrações causaram inibição da transição G1/S. Em células Hs578T e HTC foi observado um aumento da população de células subG1, além da paralização do ciclo celular. Quando foram utilizadas concentrações próximas de IC<sub>50</sub> (80  $\mu$ M e 40  $\mu$ M para o HTC e Hs578T, respectivamente), foi observada a paralização do ciclo celular em G2/M. Nestas linhagens celulares, em mesmas concentrações, as populações subG1 se apresentaram 2-5 vezes (Hs578T) e 5 vezes maiores do que as culturas de controle (HTC). Portanto esses dados mostram que o composto estudado exerce a inibição do crescimento (MCF7 e A549) e a atividade citotóxica (Hs578T e células HTC). No último caso, a morte celular observada pode ser conseqüente da indução de apoptose ou necrose. YOU et al. (2013) demonstraram que o aumento na população SubG1 sob o tratamento com Ginkgetin, um biflavonoide, foi intimamente associada à indução de apoptose. Eles verificaram que o tratamento de humanas células PC-3 (câncer de próstata), durante 24 h com Ginkgetin causou um acúmulo da população de subG1 sendo este evento acompanhado por clivagem de PARP e Caspase-3.

### 5.1.3.1.3 Viabilidade celular do galato de propila, determinado por ensaio colorimétrico (MTS).

Para o composto galato de propila isolado neste trabalho a partir de raízes de *Caesalpinia var. peltophoroides*, foram realizados testes de atividades antiproliferativas, em quatro linhagens de células de tumorais: carcinoma do pulmão humano (A549), carcinoma de mama humano (MCF-7), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e glioma humano (U251), a fim de conhecer a atividade antitumoral do composto.

Figura 20 - Viabilidade celular em culturas tratadas com galato de propila em concentrações de 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ .



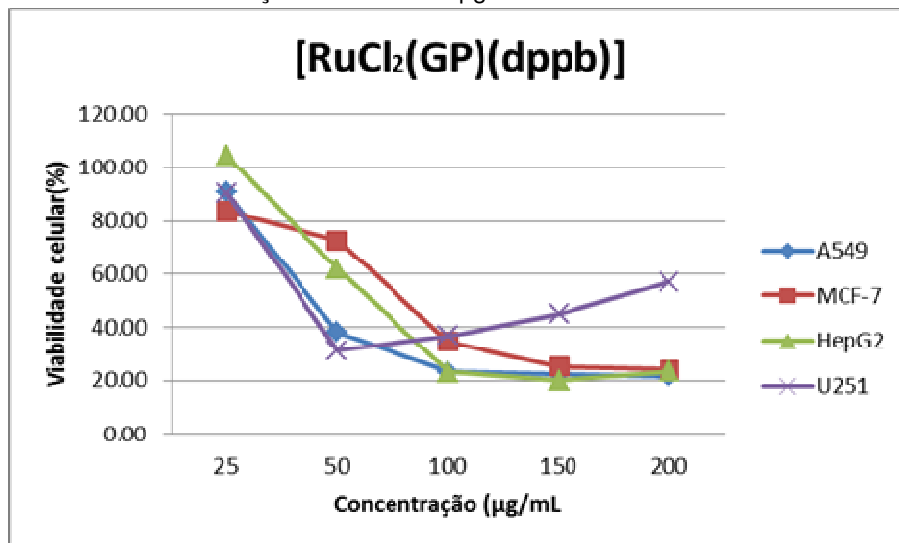
Fonte: Do autor.

Os resultados mostraram que o galato de propila foi eficaz na redução da viabilidade das células de uma forma dependente da concentração em todas as linhas celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U251). A Figura 20 mostra a redução considerável da viabilidade celular em culturas tratadas com o galato de propila em concentrações superiores a 50 µg/mL. Dentre as linhagens celulares estudadas, as linhagens de células (MCF-7) e (U251) foram as que apresentaram maior capacidade de resposta ao tratamento apresentando um valor de  $IC_{50} = 236,4 \pm 25,3 \mu\text{M}$  e  $IC_{50} = 228,9 \pm 27,37 \mu\text{M}$  respectivamente.

#### 5.1.3.1.4 Viabilidade celular do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$ , determinado por ensaio colorimétrico (MTS).

Para o complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  sintetizado a partir galato de propila isolado neste trabalho a partir de raízes de *Caesalpinia var. peltophoroides*, foram realizados testes de atividades antiproliferativas, em quatro linhagem de células de tumorais: carcinoma do pulmão humano (A549), carcinoma da mama humano (MCF-7), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e Giloma humano (U251), a fim de conhecer a atividade antitumoral do composto.

Figura 21 - Viabilidade celular em culturas tratadas com  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  em concentrações de 25 a 200 µg/mL.



Fonte: Do autor.

Os resultados mostraram que o  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  foi eficaz na redução da viabilidade das células de uma forma dependente da concentração em todas as linhas celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U251). A Figura 21 mostra a redução da viabilidade celular em culturas tratadas com o  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Dentre as linhagens celulares estudadas as linhagens de células (A549) e (U251) foram as que apresentaram maior capacidade de resposta ao tratamento apresentando um valor de  $\text{IC}_{50} = 65.46 \pm 7.1 \mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{50} = 52.1 \pm 3.0 \mu\text{M}$  respectivamente, sendo que a última apresentou uma diminuição da sua atividade inibitória após o aumento dessa concentração, comportamento inverso ao das demais linhagens. Ao comparar os dados obtidos do gráfico da Figura 20 com os dados obtidos do gráfico acima é possível confirmar um aumento na atividade inibitória sobre as linhagens (A549), (HepG2) e (U251), evidenciando que houve um aumento da atividade antiproliferativa, no composto GP após a coordenação com o precursor metálico.

#### *5.1.3.1.5 Viabilidade celular do complexo $[\text{VO}(\text{GP})_2]$ , determinado por ensaio colorimétrico (MTS).*

Para o complexo  $[\text{VO}(\text{GP})_2]$  sintetizado a partir galato de propila isolado neste trabalho a partir de raízes de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*, foram realizados testes de atividades antiproliferativas, em quatro linhagem de células de tumores: carcinoma do pulmão humano (A549), carcinoma da mama humano (MCF-7), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e Giloma humano (U251), a fim de conhecer a atividade antitumoral do composto.

Figura 22 - Viabilidade celular em culturas tratadas com [VO(GP)<sub>2</sub>] em concentrações de 25 a 200 µg/mL.

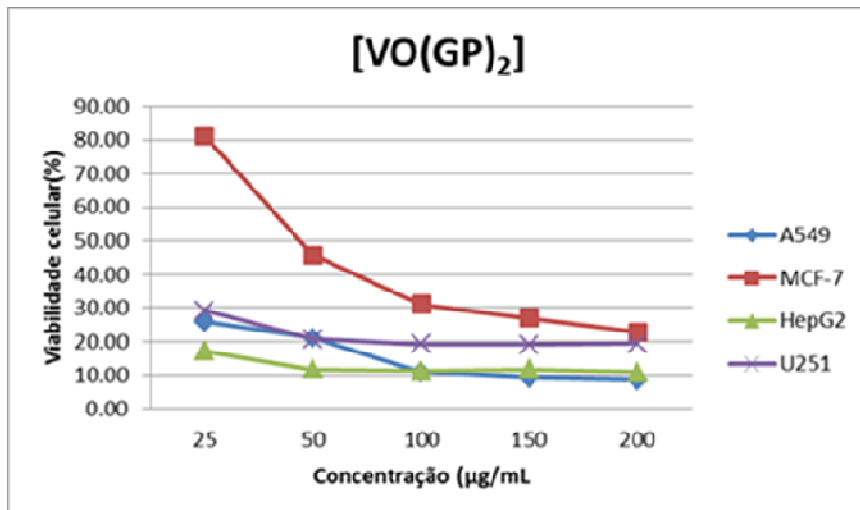
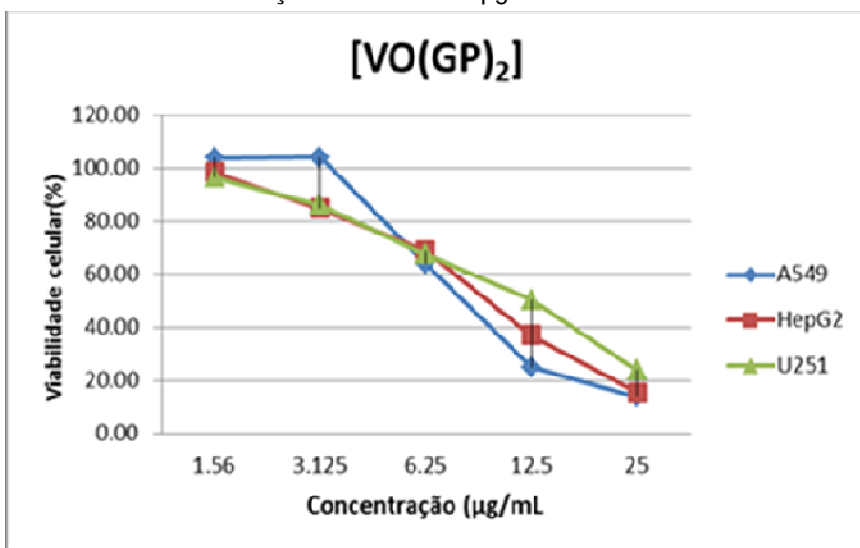


Figura 23 - Viabilidade celular em culturas tratadas com [VO(GP)<sub>2</sub>] em concentrações de 1.56 a 25 µg/mL.



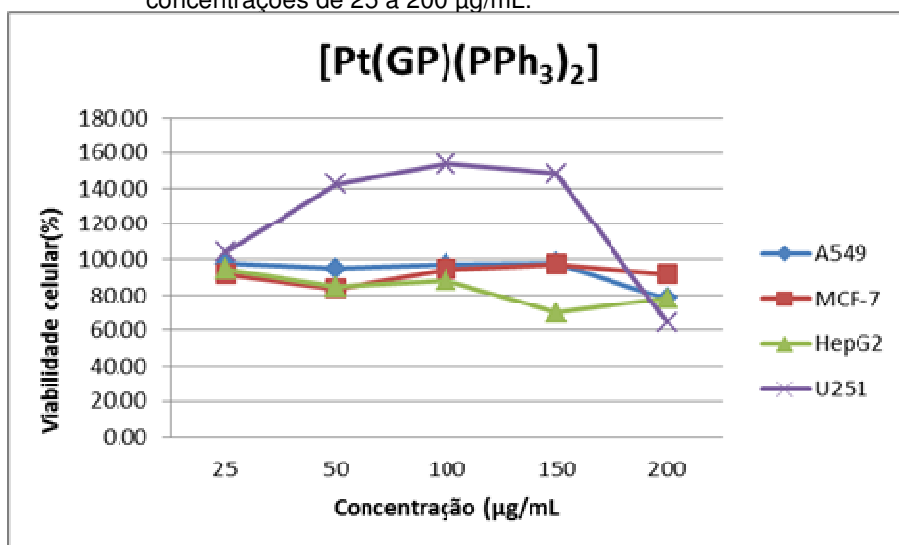
Os resultados mostraram que o [VO(GP)<sub>2</sub>] foi eficaz na redução da viabilidade das células de uma forma dependente da concentração em todas as linhagens celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U251). A mostram que houve uma redução da viabilidade celular em culturas tratadas com o [VO(GP)<sub>2</sub>] a partir de 3.125 µg/mL, para as linhagens A549, HepG2 e U251, e 50 µg/mL para a linhagem MCF-7. Dentre as linhagens celulares estudadas, as linhagem de células A549, HepG2 e U251 foram as que apresentaram maior capacidade de resposta ao tratamento apresentando um valor de  $IC_{50} = 17.31 \pm 0.11 \mu M$ ,  $IC_{50} = 19.12 \pm 0.15 \mu M$  e  $IC_{50} =$

24.03 ± 0.21 μM respectivamente. Quando as linhagens A549, HepG2 e U251 foram tratadas sob as mesmas condições, com o cisplatina, um potente agente anticâncer, o valor de IC<sub>50</sub> encontrado foi de 20,3 ± 1,6 μM, 14.5 ± 2,8 μM e 21.7 ± 1,9 μM respectivamente, comprovando que o composto apresenta um grande potencial anti-proliferativo. Ao comparar os dados obtidos do gráfico da Figura 20 com os dados obtidos do gráfico acima é possível confirmar um aumento na atividade inibitória na população sobre as linhagens carcinoma do pulmão humano (A549), (HepG2), (U251) e MCF-7 evidenciando que houve um aumento da atividade anti-proliferativa, no composto GP após a coordenação com o precursor metálico.

#### 5.1.3.1.6 Viabilidade celular do complexo [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], determinado por ensaio colorimétrico (MTS).

Para o complexo [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], sintetizado a partir galato de propila isolado neste trabalho a partir de raízes de *Caesalpinia var. peltophoroides*, foram realizados testes de atividades anti-proliferativas, em quatro linhagem de células de tumor carcinoma do pulmão humano (A549), carcinoma da mama humano (MCF-7), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e Giloma humano (U251), a fim de conhecer a atividade antitumoral do composto.

Figura 24 - Viabilidade celular em culturas tratadas com [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] em concentrações de 25 a 200 μg/mL.



Fonte: Do autor.

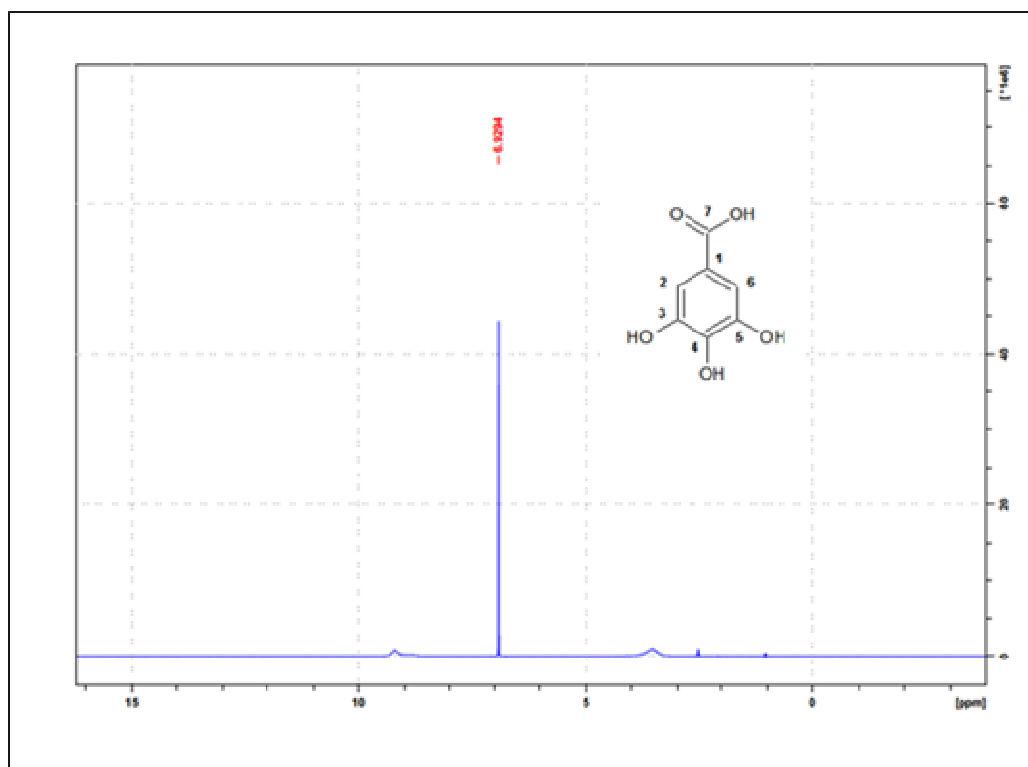
Os resultados (Figura 24) mostraram que o  $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$  não foi eficaz na redução da viabilidade das células em nenhuma das linhas celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U251).

#### **5.1.4 Elucidação estrutural da substância 1(Ácido gálico).**

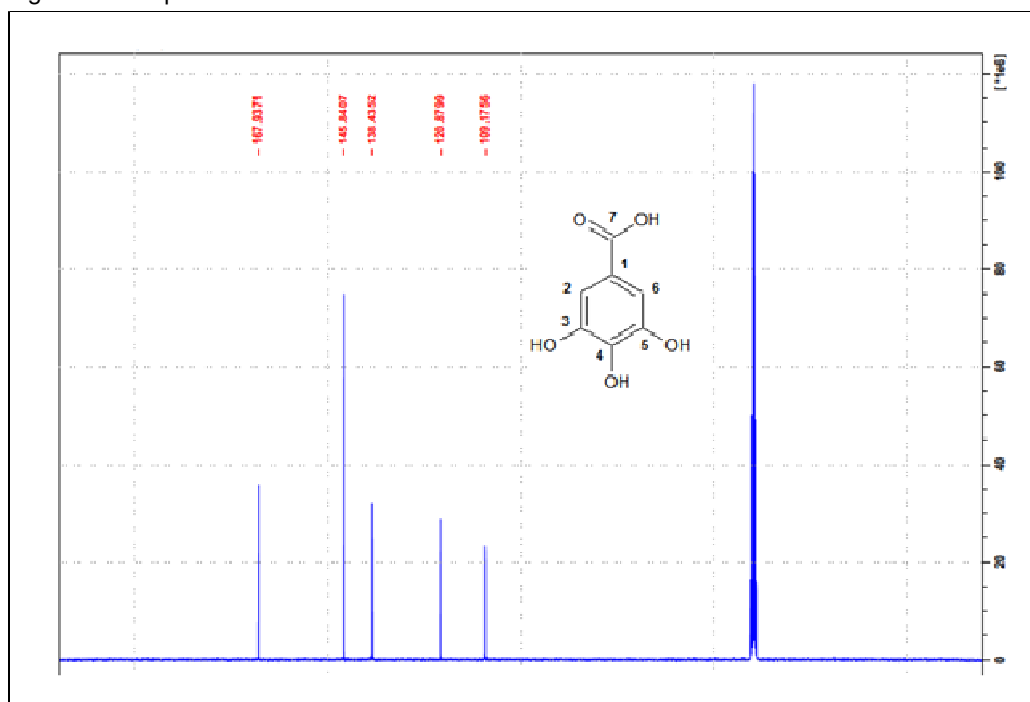
A partir da fração agrupada (1-21) recolhida do processo de purificação da Sephadex foi obtido 52 mg de cristais de coloração branca, que se mostrou pura através da cromatografia em camada delgada. Essa estrutura cristalina apresentou uma temperatura de fusão próximo de  $249^\circ\text{C}$  e foi submetida as técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT para sua elucidação estrutural.

##### 5.1.4.1 Análise do espectro de RMN DE $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e DEPT $135^\circ$ do ácido gálico.

Os espectros de RMN DE  $^1\text{H}$  (Figura 25),  $^{13}\text{C}$  (Figura 26) e DEPT  $135^\circ$  (Figura 27) da amostra 1 foram realizados em DMSO deuterado.

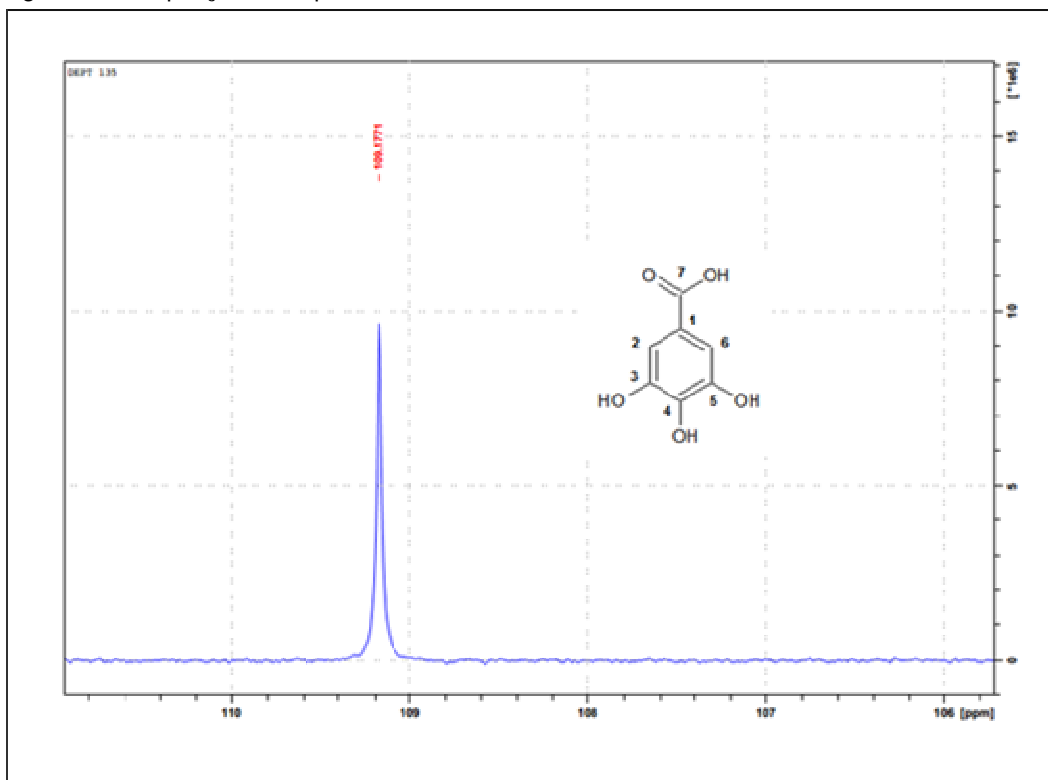
Figura 25 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1.

Fonte: Do autor.

Figura 26 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 1.

Fonte: Do autor.

Figura 27 - Ampliação do espectro de DEPT 135 ° da Substância 1.



Fonte: Do autor.

Tabela 8 - Descolamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) da substância 1.

Carbono	$\text{H}^1\delta$	$\text{C}^{13}\delta$
1	-	120,8
2,6	6,9	109,1
3,5	-	142,8
4	-	138,4
7	-	167,9

Fonte: Do autor.

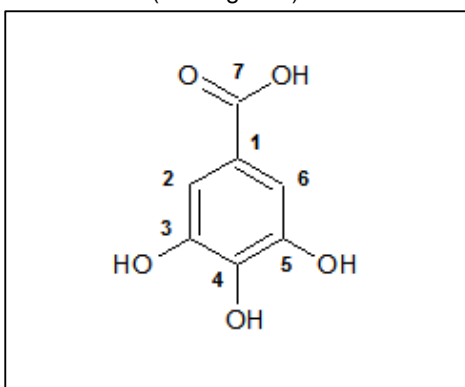
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou apenas um singlete em  $\delta$  6,9 ppm o qual pode ser atribuído aos hidrogênios aromáticos. A observação de apenas um singlete é proveniente da simetria do anel aromático.

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indicou a presença de 5 sinais que foram observados na região entre  $\delta$  109 e 145 ppm que é uma região característica de carbonos aromáticos. O sinal em  $\delta$  167,9 ppm é indicativo de deslocamento químico de carbono não hydrogenado de grupo éster, amida ou de ácido carboxílico conjugado (SILVERSTEIN, et al. 2005).

Ao analisar o espectro de DEPT 135° foi possível observar um sinal positivo obtido em  $\delta$  109,7 ppm que comprova existência dos dois carbonos de metina (CH) (SILVERSTEIN, et al. 2005).

A partir dessas análises de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135°, aliadas ao ponto de fusão da substância que foi comparado com o da literatura, levaram a identificar a substância 1, o ácido gálico, Figura 28.

Figura 28 - Estrutura química do ácido 3,4,5-triidroxibenzóico (ácido gálico).



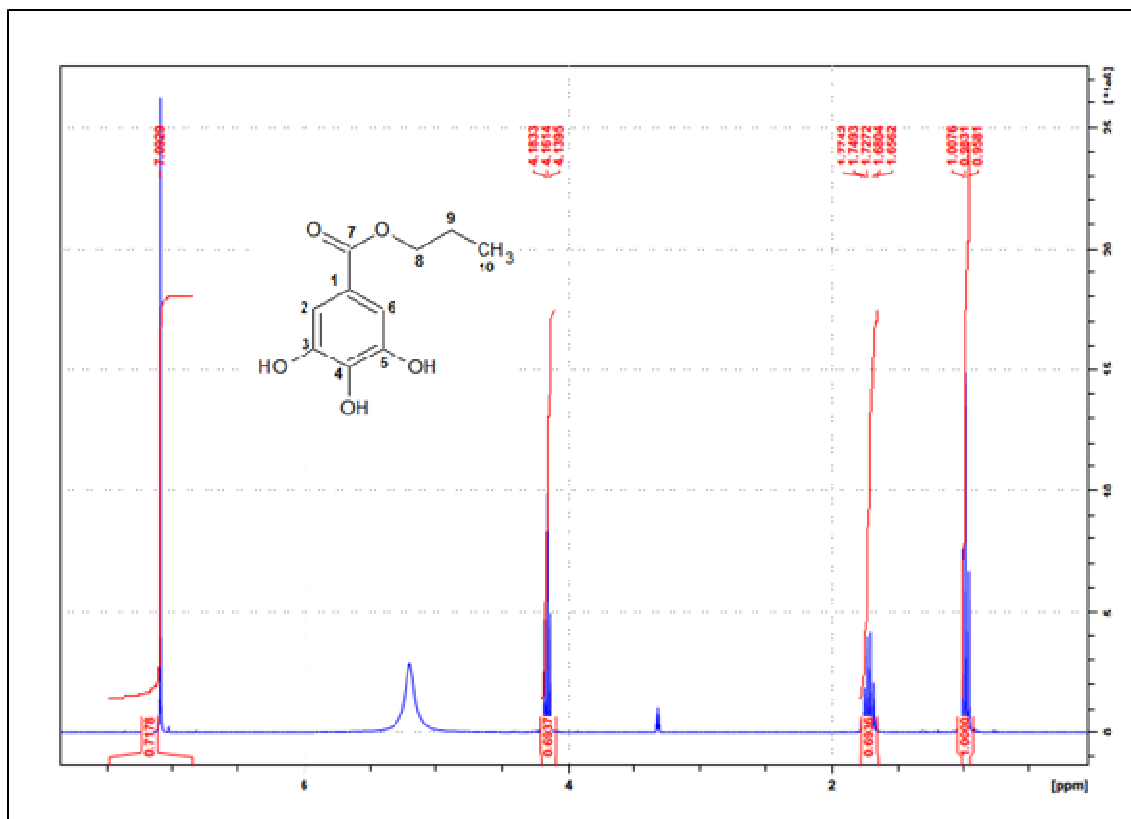
Fonte: Do autor.

### 5.1.5 Elucidação estrutural da substância 2

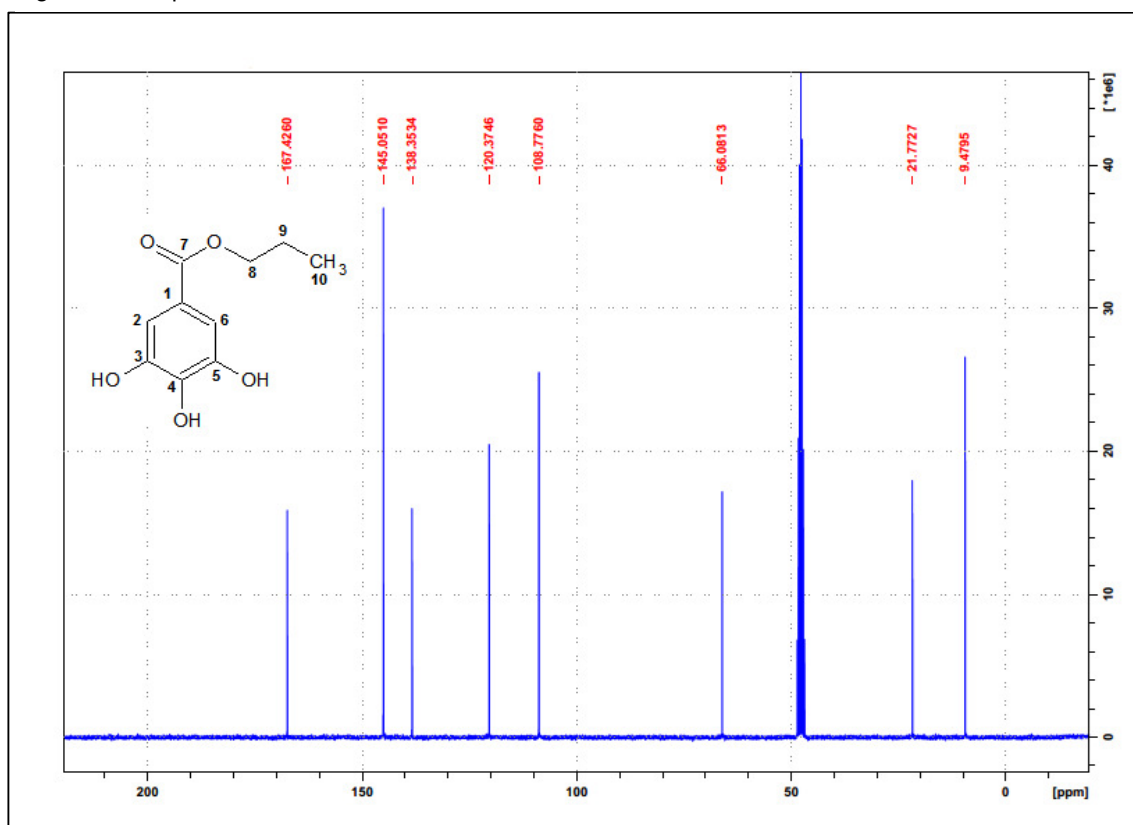
A partir da fração 22-28 recolhida do processo de purificação do Sephadex foi obtido 31 mg de cristais de coloração branca, que se mostrou pura através da cromatografia em camada delgada. Essa estrutura cristalina apresentou uma temperatura de fusão próximo de 146°C e foi submetida as técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° para sua elucidação estrutural.

#### 5.1.5.1 Espectro de RMN DE $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 ° da amostra 2 obtida de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 30) e DEPT 135° (Figura 31) foram realizados em Metanol deuterado (MeOD).

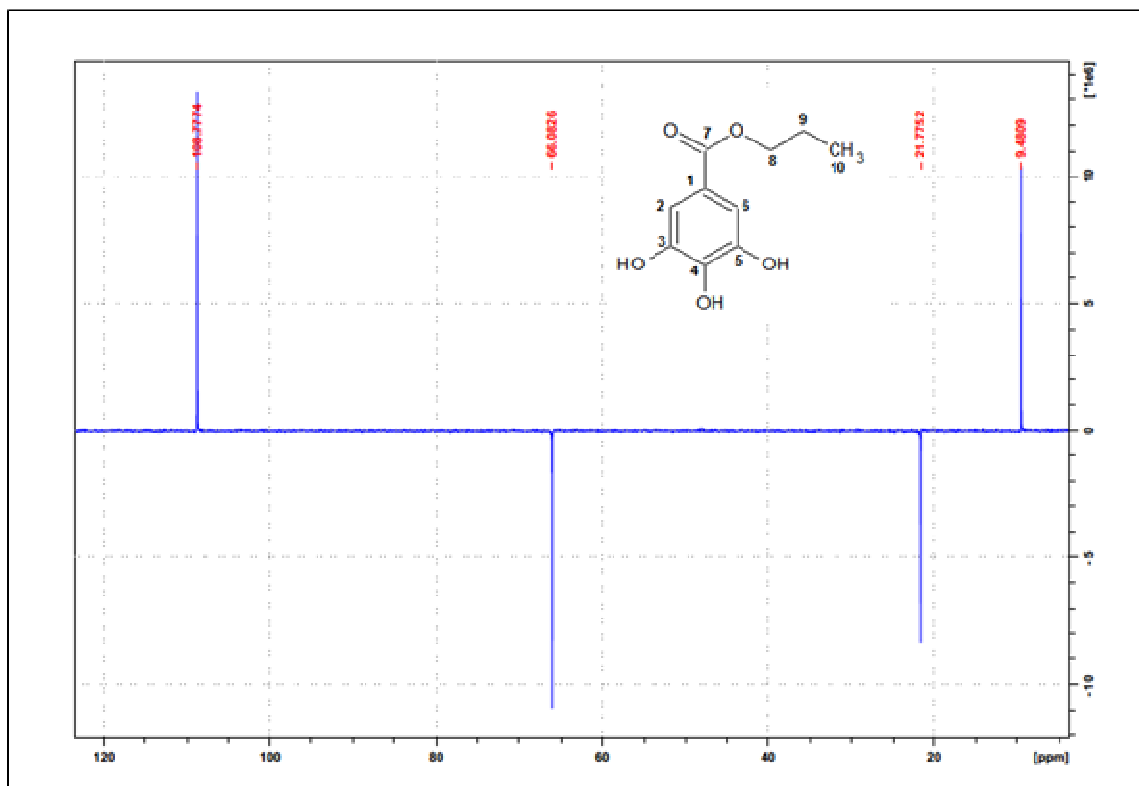
Figura 29 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 2.

Fonte: Do autor.

Figura 30 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 2.

Fonte: Do autor.

Figura 31 - Espectro de DEPT 135 ° da Substância 2



Fonte: Do autor.

Tabela 9 - Descolamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) da substância 2.

Carbono	$\text{H}^1\delta$	$\text{C}^{13}\delta$
1	-	120,37
2,6	(s)7,00	108,77
3,5	-	145,05
4	-	138,35
7	-	167,42
8	(t)4,16	66,08
9	(sx)1,74	21,77
10	(t)1,00	9,47

Fonte: Do autor.

A análise dos espectros levou a propor a substância 2 como um derivado do ácido gálico, devido à similaridade observada com os espectros da substância 1, o ácido gálico.

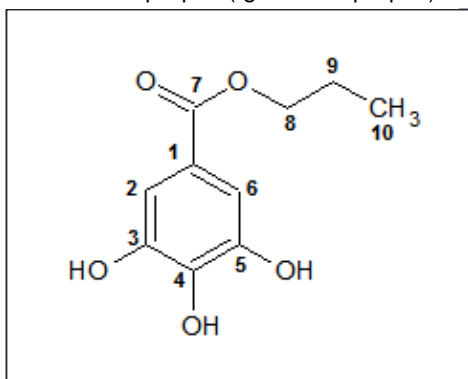
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou um singleto em  $\delta$  7,00 ppm valor atribuído a hidrogênio ligado a carbono aromático, um tripleto (acoplamento com dois hidrogênios) em  $\delta$  4,16 ppm, em uma região típica de carbono ligado a oxigênio, um

sexteto (acoplamento com 5 hidrogênios) em  $\delta$  1,74 ppm e um tripleto (acoplamento com 2 hidrogênios) em  $\delta$  1,00 ppm, que é uma região típica de alcanos.

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou 3 sinais em uma região característica de carbonos de alcanos, entre  $\delta$  9 e  $\delta$  67 ppm. Também evidenciou 4 sinais na região entre  $\delta$  108 e 167 ppm, esta característica de carbonos aromáticos. O sinal em  $\delta$  167,4 ppm refere-se ao sinal de carbono não hidrogenado do grupo éster, amida ou de ácido carboxílico conjugado. As maiores intensidades de sinais em  $\delta$  108,7 ppm e  $\delta$  145,0 ppm são características de uma simetria do anel aromático. O sinal em  $\delta$  68,0 ppm que é uma região característica de carbonos ligados a oxigênio e dois últimos sinais em  $\delta$  21,77 e 9,47 que são regiões típicas de sinais de alcanos (SILVERSTEIN, et al. 2005).

O espectro de DEPT  $135^\circ$  apresentou 4 sinais referentes a metina ( $\text{CH}$ ), metileno ( $\text{CH}_2$ ) e metila ( $\text{CH}_3$ ). O primeiro sinal em  $\delta$  9,4 ppm é atribuído ao grupo  $\text{CH}_3$ , pois seu sinal é positivo e está localizado na região característica de alcanos; o sinal em  $\delta$  21,7 ppm é atribuído ao  $\text{CH}_2$ , pois apresenta sinal negativo (inverso) e está em uma região característica de alcanos. Já o sinal em  $\delta$  60,0 ppm é atribuído ao grupo  $\text{CH}_2$ , pois apresenta sinal negativo (inverso) e está em uma região característica de éster. O último sinal obtido em  $\delta$  108,7 ppm é atribuído a um grupo  $\text{CH}$  pois apresenta um sinal positivo em uma região característica de hidrogênio aromático (SILVERSTEIN, et al. 2005). A partir dessas análises de RMN de  $\text{H}^1$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$ , aliadas ao ponto de fusão da substância que foi comparado com a da literatura, foi possível identificar a substância 2, o galato de propila (Figura 32)

Figura 32 - Estrutura química do 3,4,5 TrihidroxiBenzoato de propila ( galato de propila).



Fonte: Do autor.

## 5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE II

A parte experimental II refere-se à discussão da coordenação do galato de propila à precursores como o  $[\text{VO}(\text{acac})_2]$ ,  $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{H}_2\text{O})]$  e  $[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$ .

Nesta etapa serão discutidos os resultados de caracterização dos complexos pelas técnicas de absorção na região do infravermelho e UV/Vis, análise elementar, condutividade, voltametria cíclica e de pulso diferencial e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}^{13}$  e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  e Difração de raios X quando possível.

### 5.2.1 $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$

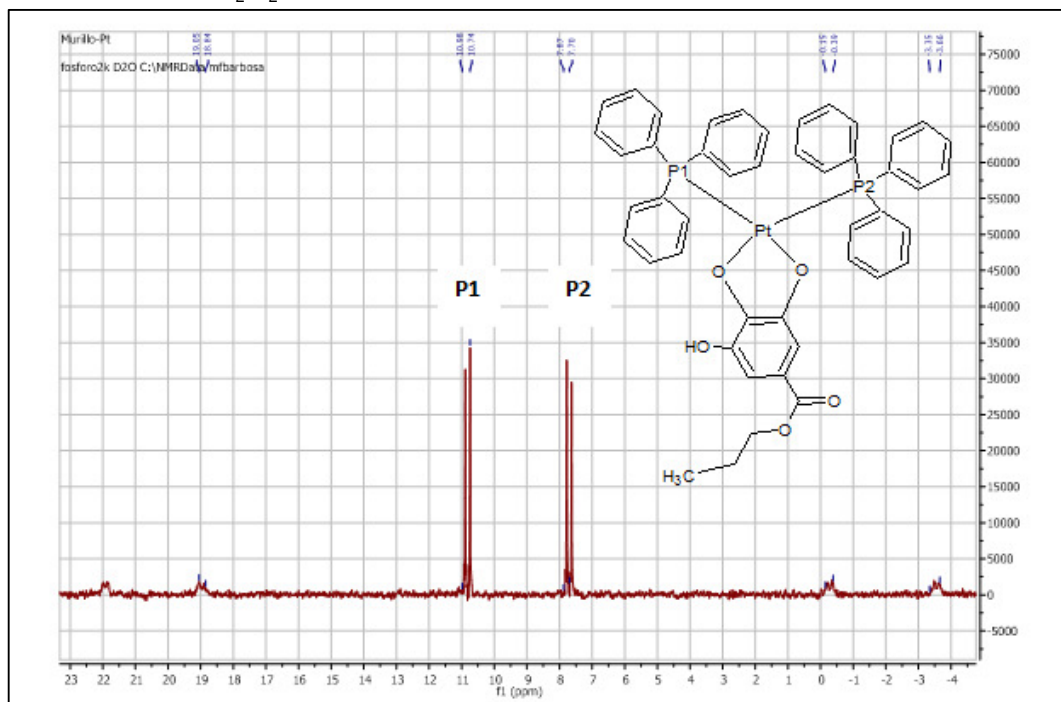
#### 5.2.1.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  obtido para o composto  $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$  (Figura 33) apresentou dois dubletos centrais mais intensos, provenientes dos núcleos de  $^{31}\text{P}$  *trans* aos átomos de oxigênio não equivalentes do galato de propila. Além disto pode ser observado dois satélites (dubletos) resultantes do acoplamento do átomo de  $^{195}\text{Pt}$  com o fósforo da monofosfina.

Neste caso foram observados dois dubletos (P1 e P2) (Figura 33), onde o dubleto (P2) em  $\delta$  7, 8 ppm encontra-se mais blindado em relação à P1  $\delta$  10, 8 ppm, .O efeito da ressonância do anel aromático faz com que o fósforo P1 seja observado em maior deslocamento, ou seja, mais desblindado.

Os valores de deslocamentos químicos e a constante de acoplamento estão dispostos na Tabela 10.

Figura 33 - Estrutura proposta e Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do  $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$ , em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



Fonte: Do autor.

Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos para o complexo  $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$ .

Composto	Deslocamento químico (ppm)		$^2J_{\text{P-P}}$ (Hz)
$[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$	10,8	7,8	33,2

Fonte: Do autor.

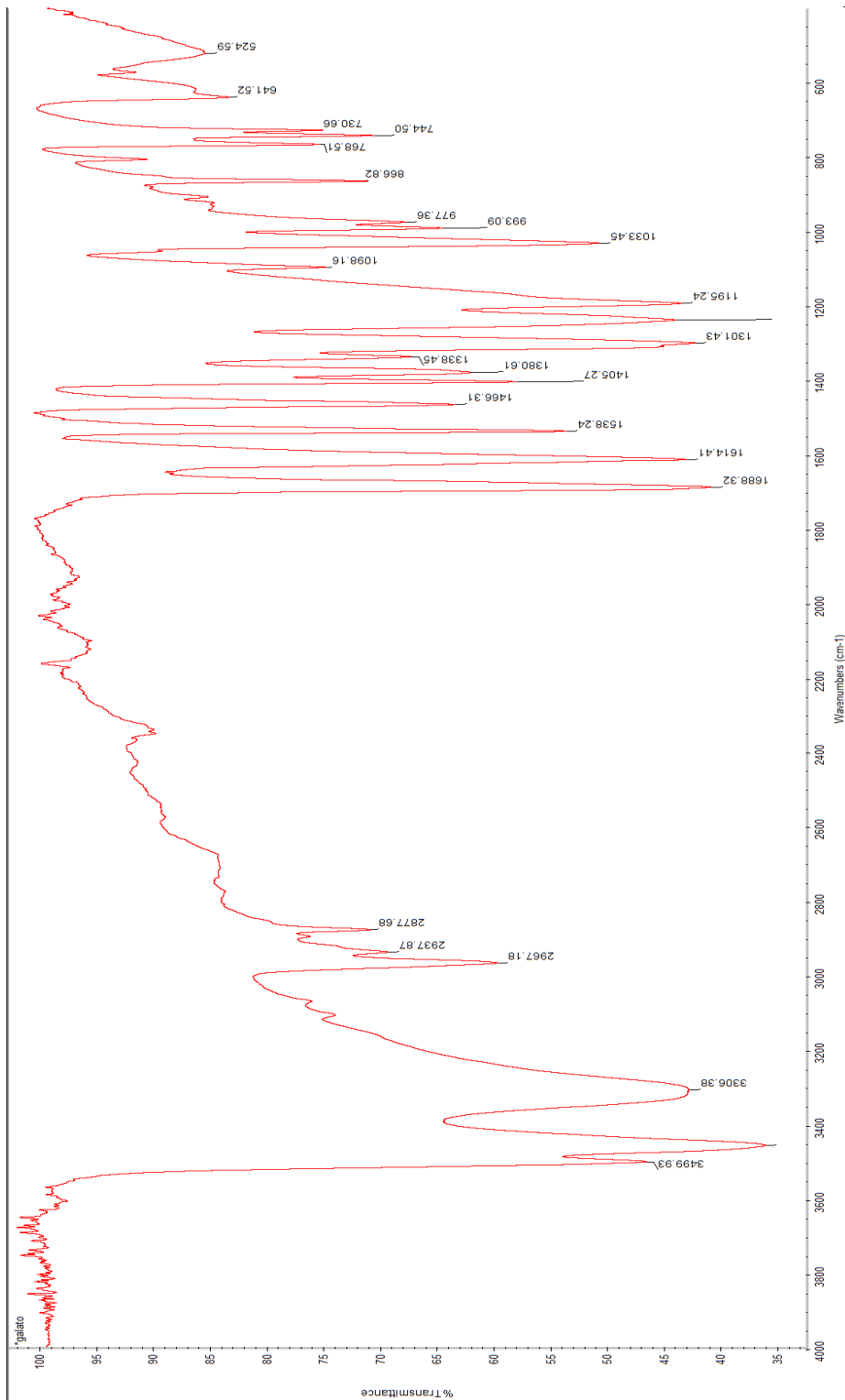
### 5.2.1.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais obtidos para este complexo apresentaram uma combinação de bandas referentes ao ligante utilizado, o galato de propila e ao precursor  $[\text{Pt}(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$ , sintetizado no laboratório de estrutura e reatividade – LERCI – UFSCar.

No espectro vibracional na região do infravermelho do galato de propila (Figura 34) foi possível observar dois estiramentos em  $\nu$  3499 e 3468  $\text{cm}^{-1}$  característico de grupos  $\nu\text{OH}$  associados ao grupo fenol. As absorções em  $\nu$  2967 e 2877  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a estiramento  $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ . A banda em 1688  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento do grupo  $\nu\text{C}=\text{O}$ . O estiramento em  $\nu$  1614  $\text{cm}^{-1}$  pode ser

atribuído ao estiramento  $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}}$  de aromático e em  $\nu$  1538  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao grupo fenila. Uma banda em  $\delta$  1466  $\text{cm}^{-1}$  pode ser associada à deformação angular assimétrica no plano ( $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}}$ ) e uma banda em  $\delta$  1405  $\text{cm}^{-1}$  referente à ( $\delta_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}}$ ) no plano. Em  $\nu$  1301 e 1248  $\text{cm}^{-1}$  podem ser observados os estiramentos referentes à vibração  $\nu_{\text{C-O-C}}$ . As três últimas bandas relevantes em  $\delta$  866, 744 e 644  $\text{cm}^{-1}$  são provenientes da deformação angular fora do plano  $\delta_{\text{C-H}}$  do anel, e por fim  $\delta$  745 e 730 deformações angulares fora do plano de  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  (SILVERSTEIN et al. 2005).

Figura 34 - Espectro vibracional na região do infravermelho do galato de propila.



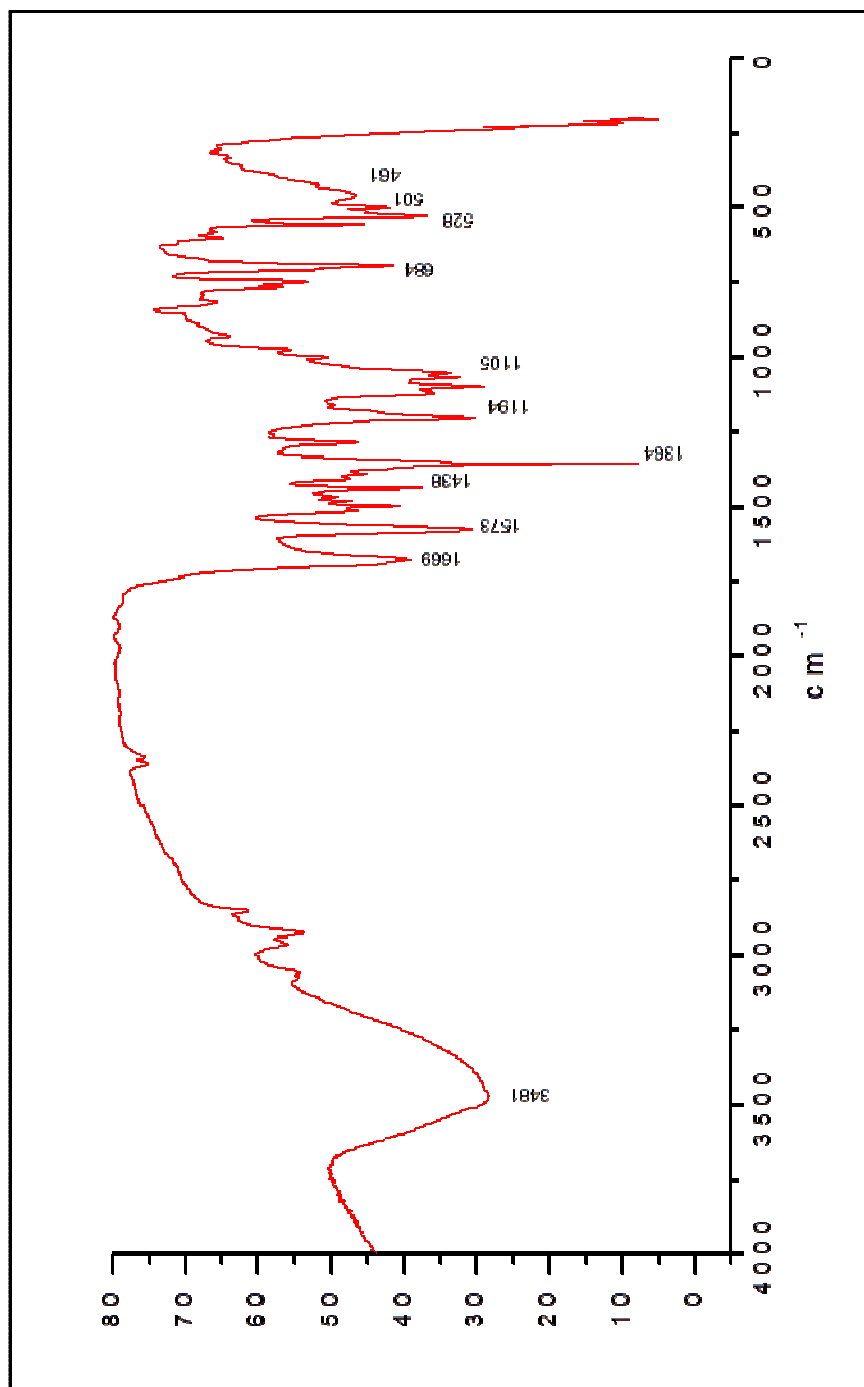
Fonte: Do autor.

Após a coordenação é possível observar (Figura 35) a ausência das bandas em  $3306$  e  $3450\text{ cm}^{-1}$ , levando-nos a propor a coordenação por dois átomos de oxigênio de duas hidroxilas. A banda observada em  $\nu 3468\text{ cm}^{-1}$ , alargada, pode ser atribuída ao estiramento da hidroxila assim como da água presente no composto.

Os estiramentos do grupo  $\nu\text{C}=\text{O}$  ( $1688\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ( $\nu_{\text{as}} 1301$  e  $\nu_{\text{s}} 1248\text{ cm}^{-1}$ ) do galato de propila (Figura 34), apresentaram deslocamentos em regiões de menor frequência em comparação ao composto quando coordenado ( $1669\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu_{\text{as}}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ( $1364$  e  $1289\text{ cm}^{-1}$ ) respectivamente (Figura 35).

Também pode ser observada uma banda larga e de pequena intensidade em  $\nu 461\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento  $\nu\text{ Pt}-\text{O}$  e duas bandas, uma em  $501\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $528\text{ cm}^{-1}$ , referentes aos estiramentos  $\text{Pt}-\text{P}$  (Figura 35).

Figura 35 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo  $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$ .



Fonte: Do autor.



Tabela 11 - Dados cristalográficos do complexo [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].

Formula empírica	C <sub>92</sub> H <sub>72</sub> O <sub>10</sub> P <sub>4</sub> Pt <sub>2</sub>	
Peso molecular	1851.55	
Temperatura	293(2) K	
Comprimento de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Triclinico	
Grupo espacial	P -1	
Dimensões da Cella Unitária	a = 11.135 Å	α = 02.5320(10)°.
	b = 13.639 Å	β = 3.3630(10)°.
	c = 27.9530(10) Å	γ = 97.700(2)°.
Volume	4089.79(15) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Densidade (calculada)	1.504 Mg/m <sup>3</sup>	
Coeficiente de absorção	3.554 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1840	
Tamanho do cristal	0.354 x 0.150 x 0.064 mm <sup>3</sup>	
Ângulo Teta para aquisição	3.006 to 25.705°.	
Coleta até teta = 25.242°	98.6 %	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	15227 / 0 / 994	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.945	
Índices R finais [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	R1 = 0.0505, wR2 = 0.1077	
Índices R (todos os dados)	R1 = 0.0963, wR2 = 0.1330	

Fonte: Do autor.

Tabela 12 - Principais comprimentos de ligações [Å] e valores de ângulos [°] selecionados para os compostos [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].

<b>[Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]</b>	
Pt(1)-O(5)	2.026(5)
Pt(1)-O(4)	2.060(5)
Pt(1)-P(3)	2.2378(19)
Pt(1)-P(4)	2.247(2)
Pt(2)-O(2)	2.024(5)
Pt(2)-O(1)	2.043(5)
Pt(2)-P(2)	2.241(2)
Pt(2)-P(1)	2.246(2)
O(5)-Pt(1)-O(4)	82.79(19)
O(5)-Pt(1)-P(3)	89.08(14)
O(4)-Pt(1)-P(3)	171.41(14)
O(5)-Pt(1)-P(4)	172.35(14)
O(4)-Pt(1)-P(4)	89.79(15)
P(3)-Pt(1)-P(4)	98.43(7)
O(2)-Pt(2)-O(1)	82.8(2)
O(2)-Pt(2)-P(2)	92.24(16)
O(1)-Pt(2)-P(2)	174.96(17)
O(2)-Pt(2)-P(1)	169.05(15)
O(1)-Pt(2)-P(1)	86.53(16)
P(2)-Pt(2)-P(1)	98.44(8)
C(54)-P(1)-Pt(2)	107.8(3)
C(16)-P(1)-Pt(2)	123.0(2)
C(44)-P(1)-Pt(2)	111.1(3)

Fonte: Do autor.

Nesse complexo observou-se uma geometria quadrado planar oriunda de uma hibridização  $d^2sp^3$  ligeiramente distorcida em função dos ângulos dos quelatos se apresentarem distantes de  $90^\circ$  (Tabela 12).

Nos complexos desta série o galato de propila coordenou-se de forma bidentada pelos oxigênios de duas hidroxilas.

As distâncias de ligação Pt(1)-O(5) apresentou menor comprimento da ligação 2.026(5) Å comparada a Pt(1)-O(4) 2.060 (3) Å, isso se deve ao efeito indutivo da hidroxila não coordenada. Esta mesma hidroxila é responsável pela pequena variação no comprimento da ligação Pt(1)-P(3) em relação Pt(1)-P(4), 2.2378(19) e 2.247(2) Å, respectivamente. Esta distância pode ser vista no espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , onde átomo de fósforo trans ao oxigênio vizinho a hidroxila não coordenada mostrou-se mais blindado em relação ao fósforo P1.

Cabe ressaltar que os dados cristalográficos obtidos até o momento podem esclarecer e confirmar apenas a estrutura proposta e o modo de coordenação do galato de propila ao centro metálico. Novas tentativas para a obtenção de novos cristais, com melhor qualidade, estão sendo realizadas. Ademais a nova coleta de dados deverá ser feita em baixa temperatura, o que contribuirá para uma melhora nos dados cristalográficos.

#### 5.2.1.4 Medidas de Condutividade Molar e Análise Elementar

A análise elementar e a condutividade molar sustentam as estruturas propostas e a pureza do complexo. A medida de condutividade molar foi efetuada utilizando-se concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ , à  $25^\circ \text{ C}$ , em diclorometano, Tabela 13.

Tabela 13 - Dados de análise elementar e condutividade do complexo  $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$ .

Complexos	Análise elementar		Condutividade molar ( $\mu\text{s/cm}$ )
	% C	% H	
	57,0	6,7	0,038
$[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(57,2) <sup>1</sup>	(4,6) <sup>1</sup>	(0,022) <sup>2</sup> neutro

Fonte: Do autor.

<sup>1</sup> Para análise elementar os resultados entre parênteses são teóricos.

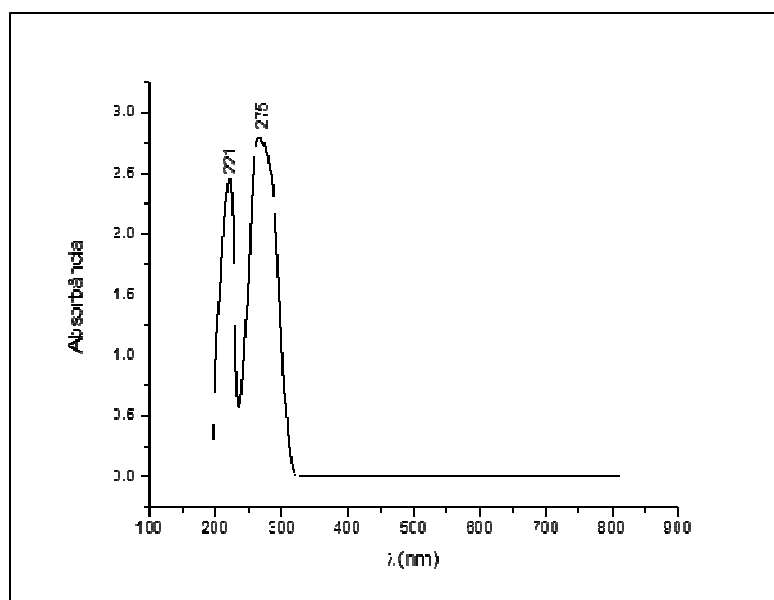
<sup>2</sup> Para a condutividade molar os resultados entre parênteses referem-se ao branco.

### 5.2.1.5 Espectroscopia de Absorção na Região do UV/vis

A atribuição dos espectros de absorção na região do ultravioleta do complexo [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] foi feita baseando-se na comparação dos espectros do complexo com o galato de propila. O espectro eletrônico do galato de propila, em solução de metanol, apresenta bandas em 264 ( $\epsilon=7000 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) atribuídas a transição de carga IL,  $\pi \rightarrow \pi^*$ . As atribuições, assim como os valores de absorvidade molar para este estão dispostas na Tabela 14.

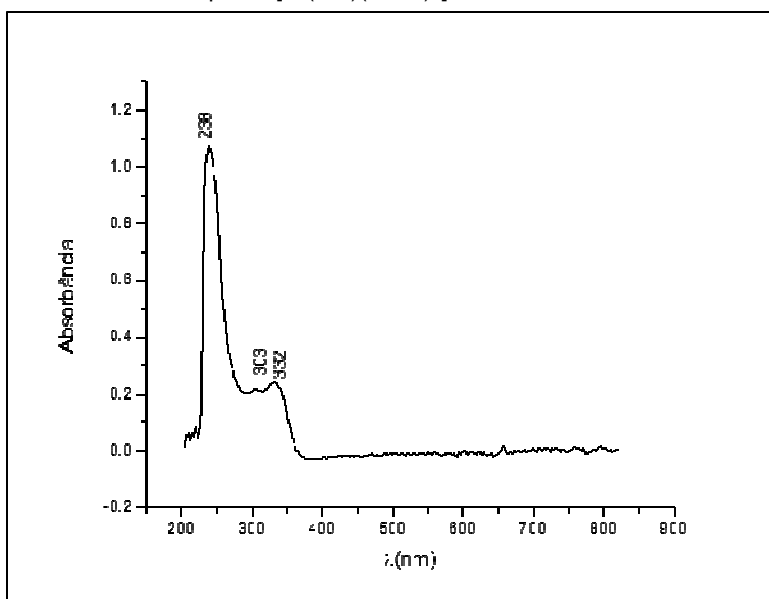
O espectro eletrônico do complexo [Pt(GP)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], em solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, apresentou bandas em 303 nm ( $\epsilon = 2746 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e 332 nm ( $\epsilon = 3185 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) atribuídas a transição de carga ligante  $\rightarrow$  metal, platina e monofosfina respectivamente. As atribuições, assim como os valores de absorvidade molar para esta série estão dispostos na Tabela 14.

Figura 37 - Espectro de absorção na região do UV-visível galato, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



Fonte: Do autor.

Figura 38 - Espectro de absorção na região do UV-visível do complexo  $[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



Fonte: Do autor.

Tabela 14 - Tentativa de atribuição das bandas de absorção na região do UV-vis para o complexo de platina.

	$(\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	
<b>GP</b>	<b>Absorbância (<math>\epsilon</math>)</b>	<b>Tentativa de atribuição</b>
267	7000	$\text{IL } \pi \rightarrow \pi^*$
<b><math>[\text{Pt}(\text{GP})(\text{PPh}_3)_2]</math></b>	<b>Absorbância (<math>\epsilon</math>)</b>	<b>Tentativa de atribuição</b>
303	ombro	TCLM
332	3185	TCLM

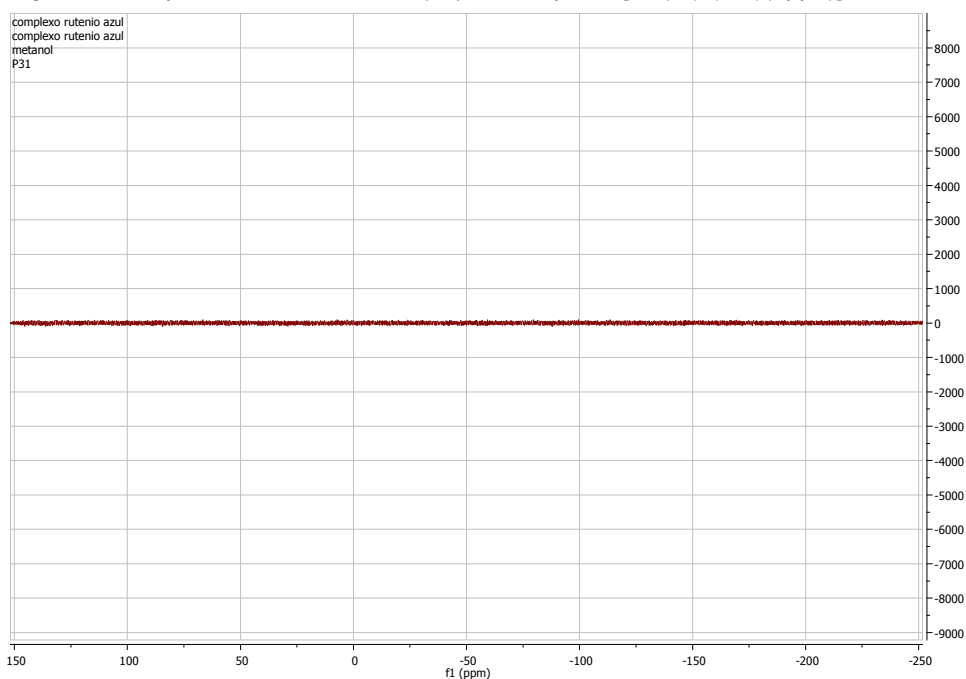
Fonte: Do autor.

## 5.2.2 [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)]

### 5.2.2.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}, EPR e susceptibilidade magnética

O complexo [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)] não apresentou nenhum sinal na ressonância magnética nuclear de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (Figura 39) sugerindo nos que não houve a redução do metal, e portanto, obtivemos um complexo com estado oxidação III. Este fato pode ser confirmado através das técnicas de EPR e suscetibilidade magnética.

Figura 39 - Espectro de RMN de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} do composto [Ru(Cl)<sub>2</sub>(GP)(dppb)].



Fonte: Do autor.

A caracterização com a técnica de EPR encontra-se em fase de finalização, no entanto por meio do experimento de susceptibilidade magnética confirmou-se que o complexo apresenta apenas 1 elétron desemparelhado. O valor do momento magnético, calculado a partir da susceptibilidade magnética para o complexo [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)], foi 0,71. Este valor é característico para sistemas d<sup>5</sup> de spin baixo, usuais para complexos de Ru<sup>III</sup> (BARBOSA, 2007).

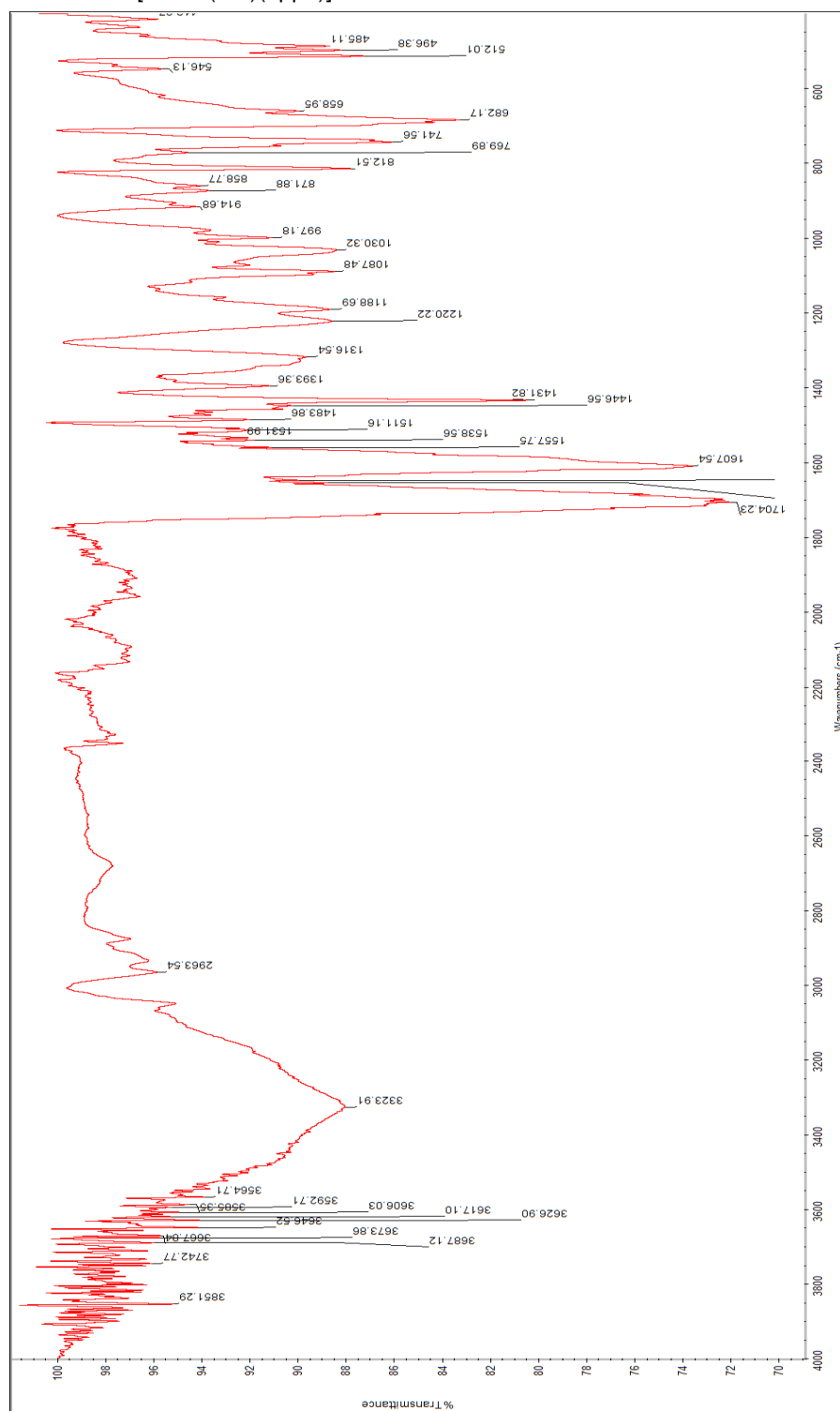
### 5.2.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

No espectro da Figura 40, observou-se após a coordenação a ausência das bandas atribuídas ao estiramento da hidroxila  $\nu\text{O-H}$ . A região característica dos estiramentos do grupo  $\nu\text{C=O}$  ( $1688\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu\text{C-O-C}$  ( $1301$  e  $1248\text{ cm}^{-1}$ ) no galato de propila livre apresentam um pequeno deslocamento no sentido de maior absorção. Este aumento é proveniente do fortalecimento do caráter da dupla ligação ( $\text{C=O}$ ), após a coordenação do oxigênio ao metal,  $1704$ ,  $1393$  e  $1331\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu\text{C=O}$  e  $\nu_{\text{as}}$  e  $\nu_{\text{s}}$   $\text{C-O-C}$ , respectivamente.

Na região de  $1610 - 1400\text{ cm}^{-1}$  também são observadas bandas atribuídas aos estiramentos  $\text{C=C}$  nos anéis aromáticos;  $1400 - 990\text{ cm}^{-1}$ , região dominada por deformações angulares da ligação  $\text{C-H}$  no plano;  $990 - 600\text{ cm}^{-1}$ , também dominada por deformações angulares fora do plano dos estiramentos  $\text{C-H}$  dos anéis aromáticos da bifosfina (SILVERSTEIN, et al. 2005).

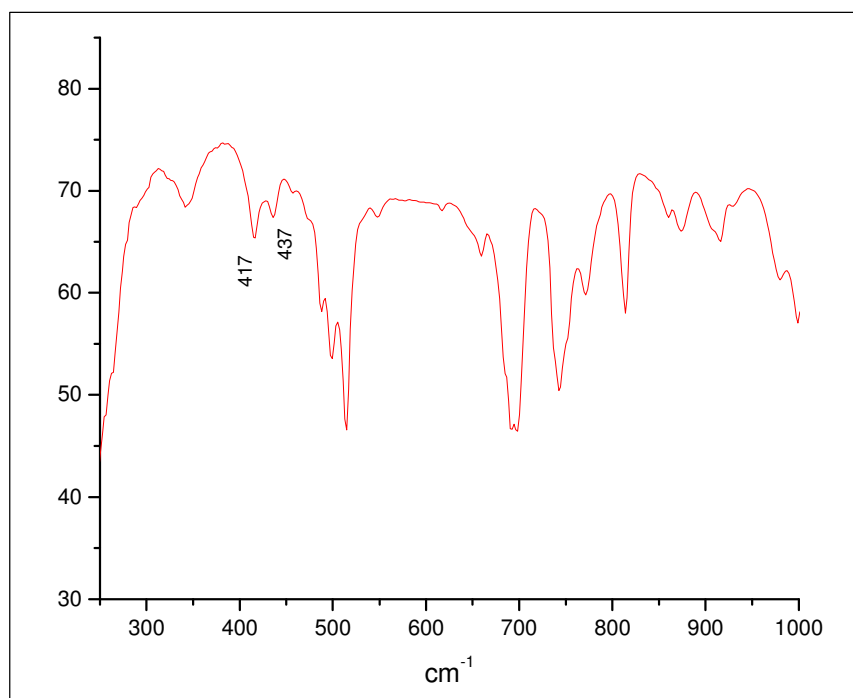
Na região de  $512$  a  $486\text{ cm}^{-1}$  também podem ser observadas as bandas referentes aos estiramentos  $\text{Ru-P}$  e  $\text{Ru-O}$  (BARBOSA, 2007; SILVERSTEIN, et al. 2005). Também podem ser observadas (Figura 41) as bandas as quais nesta tentativa de atribuição, foram designadas aos estiramentos  $\nu\text{ Ru-Cl}$  ( $417$  e  $437\text{ cm}^{-1}$ ) (BARBOSA, 2007; SILVERSTEIN, et al. 2005).

Figura 40 - Espectro vibracional na região do infravermelho do [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)].



Fonte: Do autor.

Figura 41 - Ampliação do espectro vibracional na região do infravermelho do  $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{GP})(\text{DPPB})]$ , em pastilha de KBr.



Fonte: Do autor.

### 5.2.2.3 Medidas de Condutividade Molar e Análise Elementar

A análise elementar e a condutividade molar sustentam a estrutura proposta e a pureza do complexo. A medida de condutividade molar foi efetuada utilizando-se concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ , à  $25^\circ \text{ C}$ , em diclorometano,

Tabela 15

Tabela 15 - Dados de análise elementar e condutividade do complexo de Ru(III).

Complexos	Análise elementar		Condutividade molar	
	% C	% H	( $\mu\text{s/cm}$ )	
$[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{GP})(\text{dppb})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	53,4 (53,9)	4,9 (5,1)	0,186 (0,052) <sup>2</sup>	neutro

Fonte: Do autor.

<sup>1</sup> Para análise elementar os resultados entre parênteses são teóricos.

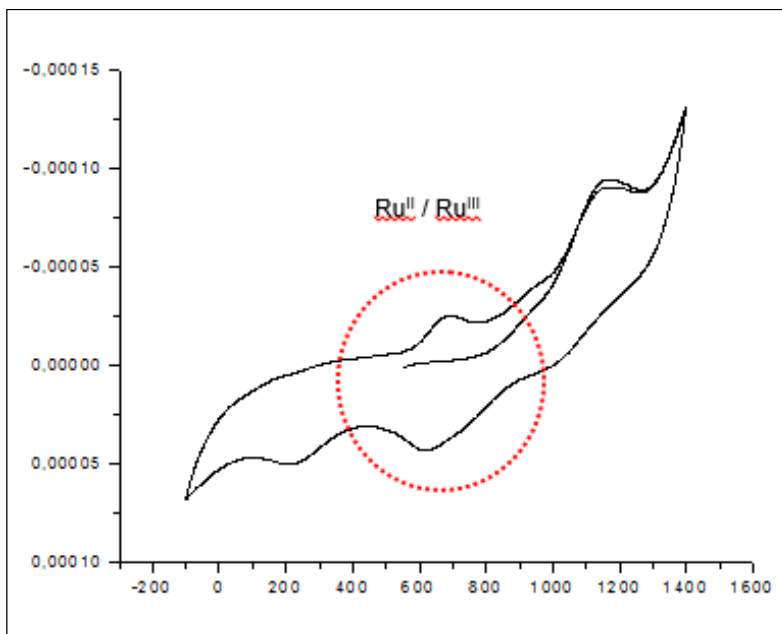
<sup>2</sup> Para a condutividade molar os resultados entre parênteses referem-se ao branco.

#### 5.2.2.4 Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Pulso Diferencial)

As técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial) permitem a avaliação da energia necessária para efetuar a oxidação ou redução dos compostos em questão. Para compostos de coordenação esta energia, em forma de potencial, fornece entendimentos adicionais aos estudos de propriedades receptoras - doadoras dos ligantes, pois estão intimamente ligadas à densidade eletrônica nas camadas de valência do metal.

O complexo de  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  apresentou comportamento eletroquímico característico para complexos de Ru(III) (BARBOSA, 2007). Na Figura 42, partindo-se do potencial de repouso, 500 mV e seguindo para sentido anódico nenhum processo foi observado como esperado, invertendo-se o sentido da varredura para sentido catódico observou-se a redução do rutênio e posteriormente sua oxidação, referente ao par redox  $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ , (Figura 42).

Figura 42 - Voltamograma cíclico do complexo  $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{GP})(\text{dppb})]$ , utilizando eletrodo de platina vs Ag/AgCl, PTBA (0,1 mol/L) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



Fonte: Do autor

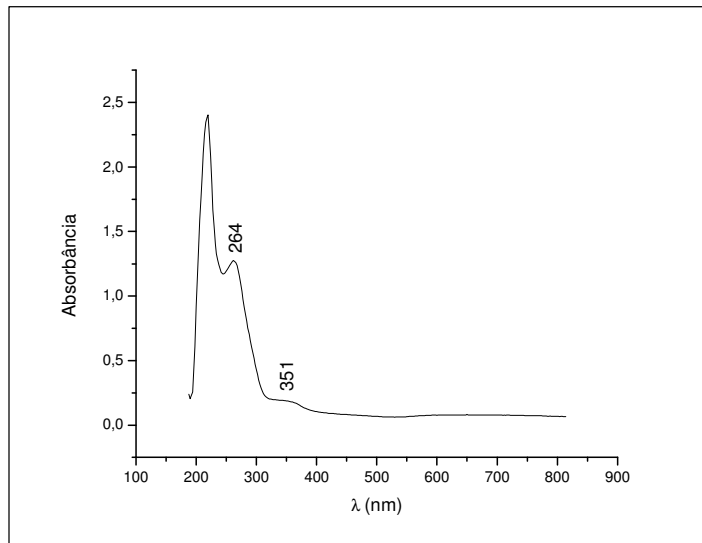
### 5.2.2.5 Espectroscopia de Absorção na Região do UV/vis

A atribuição dos espectros de absorção na região do ultravioleta do complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  foi feita baseando-se na comparação entre os espectros do precursor  $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{H}_2\text{O}]$  e do galato de propila.

Também cabe ressaltar que o precursor  $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{H}_2\text{O}]$  apresenta uma banda em 540 nm, atribuída à transição de carga TLM do  $p(\pi) (\text{Cl}) \rightarrow d\pi \text{Ru(III)}$ , (BARBOSA, 2007)

O espectro eletrônico do complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{GP})(\text{dppb})]$  (Figura 43), em solução de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , apresentou bandas em 264 ( $\epsilon = 19812 \times 10^3 \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) e 351 ( $\epsilon = 2921 \times 10^3 \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) atribuídas a transição de carga intraligante do galato de propila e dppb e transição de carga metal-ligante (MLCT), respectivamente. As atribuições, assim como os valores de absorvidade molar para esta série estão dispostas na Tabela 16.

Figura 43 - Espectro de absorção na região do UV-visível  $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{GP})(\text{dppb})]$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



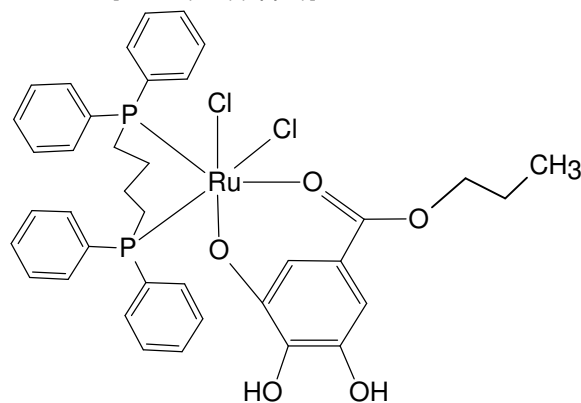
Fonte: Do autor.

Tabela 16 - Tentativa de atribuição das bandas de absorção na região do UV-Vis para o complexo de platina.

$(\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$		
GP	Absorbância ( $\epsilon$ )	Tentativa de atribuição
267	7000	IL $\pi \rightarrow \pi^*$
<b>[RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)]</b>	<b>Absorbância (<math>\epsilon</math>)</b>	<b>Tentativa de atribuição</b>
264	19812	IL $\pi \rightarrow \pi^*$ (dppb e GP)
351	2921	(dppb) $\rightarrow d\pi \text{ Ru(III)}$

Fonte: Do autor.

Baseando-se nas técnicas de caracterização utilizadas, a estrutura proposta para o complexo de Ru(III) é demonstrada na Figura 44. Assim foi possível sugerir a coordenação do galato de propila pelo átomo de oxigênio da carbonila e pelo átomo de oxigênio da hidroxila formando uma ligação com anel de seis membros. Cabe ainda ressaltar que a técnica de EPR a qual elucida e comprova a obtenção do complexo [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)], ainda encontra-se em fase de finalização, ou seja, a tentativa de atribuição foi baseada nas técnicas acima descrita.

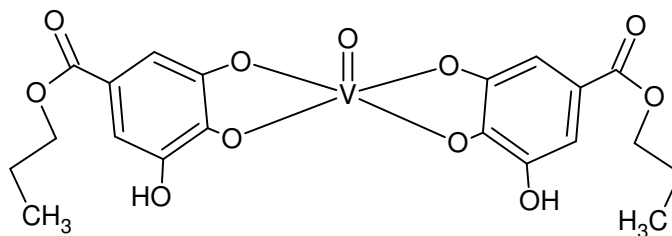
Figura 44 - Estrutura proposta para o complexo [RuCl<sub>2</sub>(GP)(dppb)].

Fonte: Do autor.

### 5.2.3 [VO(GP)<sub>2</sub>]

A estrutura proposta para o complexo obtido da reação entre [VO(Acac)<sub>2</sub>] (IV) e o galato de propila encontra-se ilustrado na Figura 45.

Figura 45. Estrutura proposta para o complexo [VO(GP)<sub>2</sub>].



Fonte: Do autor.

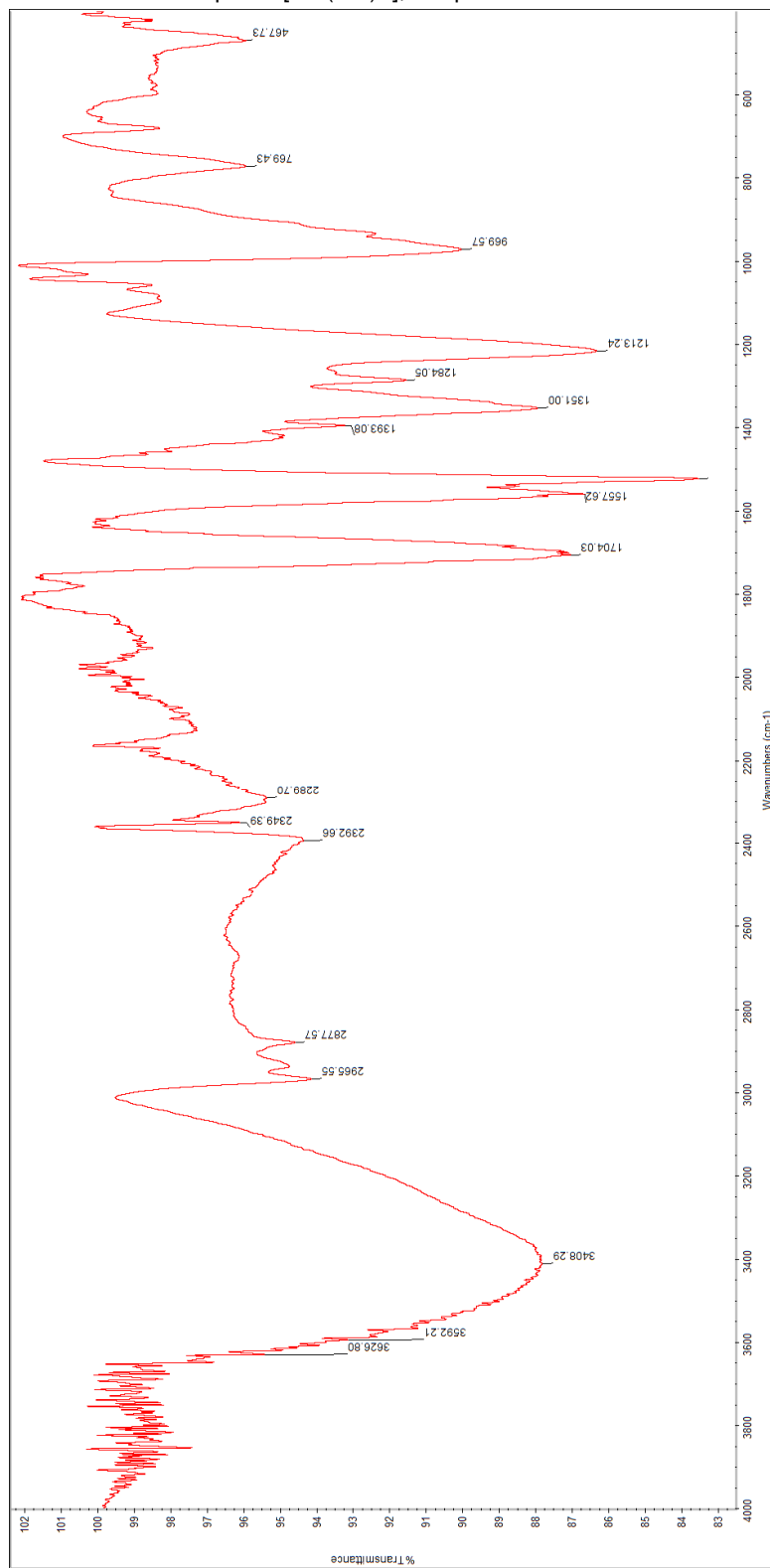
O complexo [VO(GP)<sub>2</sub>] foi caracterizado pelas técnicas de absorção na região do infravermelho e UV/Vis, análise elementar, condutividade, voltametria cíclica e de pulso diferencial e susceptibilidade magnética. A caracterização pela técnica de EPR ainda não foi finalizada.

#### 5.2.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Após a coordenação é possível observar na Figura 46, o desaparecimento das bandas referentes aos estiramentos das hidroxilas. A região característica de estiramentos do grupo  $\nu\text{C}=\text{O}$  ( $1688\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ( $1301$  e  $1284\text{ cm}^{-1}$ ) observadas no galato de propila apresentaram um pequeno deslocamento considerável no sentido de maior absorção, após coordenação ao centro metálico,  $1704\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{\text{as}}$  e  $\nu_{\text{s}}$   $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ( $1351$  e  $1284\text{ cm}^{-1}$ ), respectivamente.

A banda observada em  $969\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento  $\nu\text{V}=\text{O}$ , banda esta, característica de vanadilo complexos (ROMERA, 2007). A banda de pequena intensidade, alargada em  $\nu\text{ }467\text{ cm}^{-1}$  pode ser uma evidencia da coordenação pelos átomos de oxigênios da hidroxila.

Figura 46 - Espectro vibracional na região do infravermelho do composto [VO(GP)2], em pastilha de KBr.



Fonte: Do autor.

### 5.2.3.2 Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Pulso Diferencial)

O voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo  $[VO(GP)_2]$  foram obtidos em  $CH_2Cl_2$ , eletrodo de trabalho de Pt, Ag/AgCl como eletrodo de referência e como eletrólito suporte perclorato de tetrabutilamônio (PTBA, 0,1M). O voltamograma cíclico e de pulso diferencial estão dispostos nas Figura 47, Figura 48 e Figura 49.

Figura 47 - Voltamograma cíclico do complexo  $[VO(GP)_2]$ , ( $CH_2Cl_2$ , 0,1M PTBA).

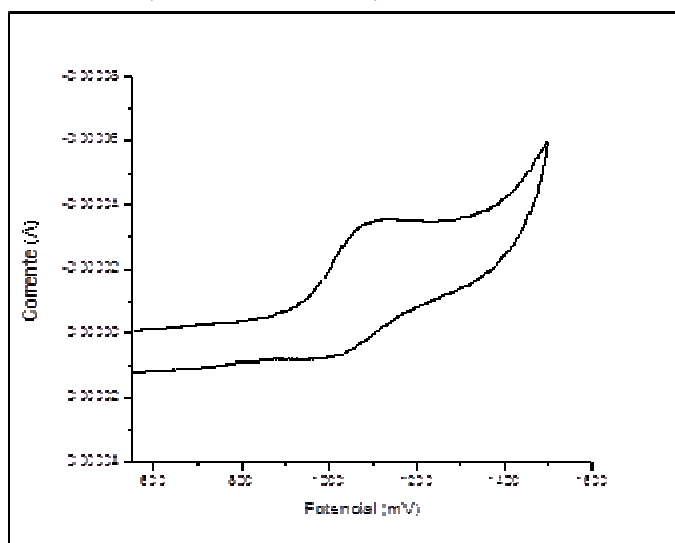
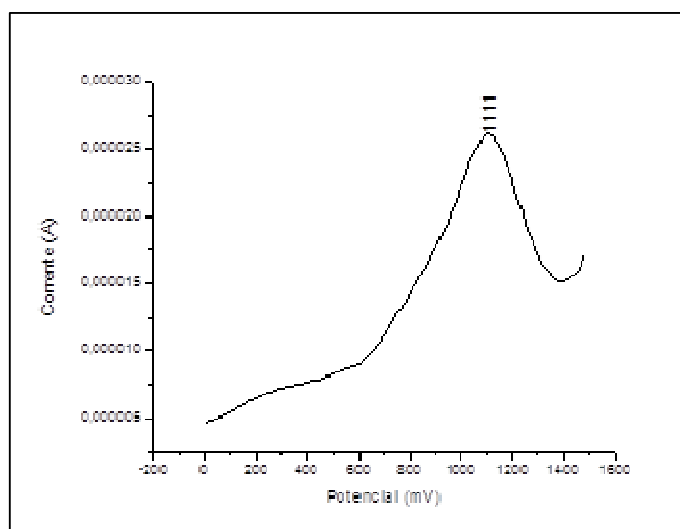
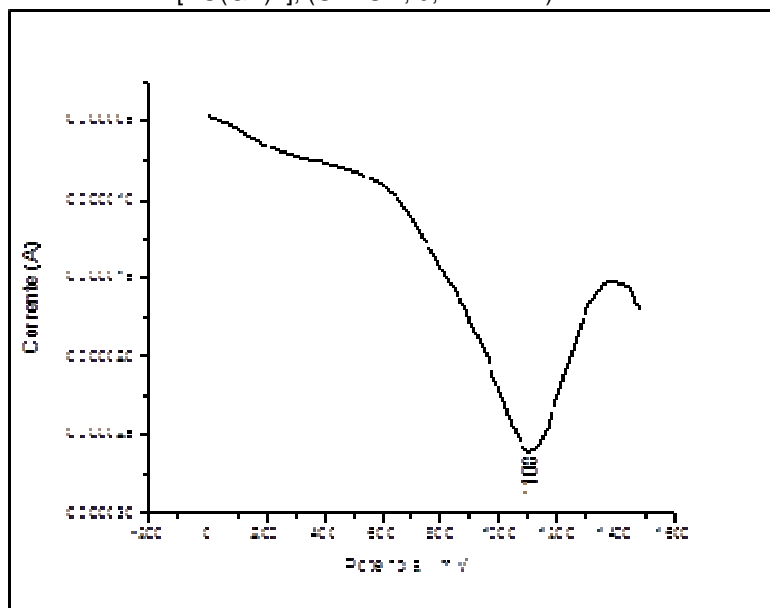


Figura 48 - Voltamograma de pulso diferencial do complexo  $[VO(GP)_2]$ , ( $CH_2Cl_2$ , 0,1M PTBA).



Fonte: Do autor.

Figura 49 - Voltamograma de pulso diferencial do complexo [VO(GP)<sub>2</sub>], (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,1M PTBA).



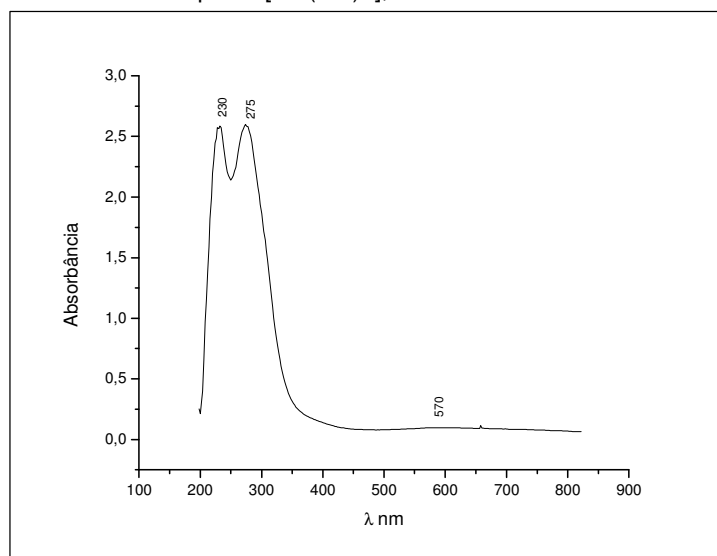
Fonte: Do autor.

O complexo apresentou na voltametria cíclica um processo quasi-reversível em aproximadamente 1100 mV, o qual pode ser atribuído à oxidação do par VO<sup>IV</sup>/VO<sup>V</sup>, os valores de  $i_{pa}/i_{pc}$  e potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) são 1,2 e 1109 mV, respectivamente.

### 5.2.3.3 Espectroscopia de Absorção na Região do UV/vis

O espectro eletrônico do complexo [VO(GP)<sub>2</sub>] (Figura 50), em solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, apresentou duas bandas uma em 230 e outra em 275 nm ( $\epsilon=19812 \times 10^3 \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) atribuída a transição de carga intraligante do galato de propila e transição de carga metal-ligante (MLCT), respectivamente. Também pode-se observar uma banda de baixa intensidade em aproximadamente 570 nm a qual pode ser atribuída à transição d – d do ion vanadila. Essas bandas são de baixa absorvidade molar  $\epsilon$ , pois as transições são “proibidas” por laporte, ou seja, a probabilidade desta banda acontecer é restrita, em consequência da sua baixa intensidade.

Figura 50 - Espectro de absorção na região do UV-visível do complexo  $[\text{VO}(\text{GP})_2]$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



Fonte: Do autor.

#### 5.2.3.4 Medidas de condutividade molar, análise elementar e susceptibilidade magnética

A análise elementar e a condutividade molar sustentam as estruturas propostas e a pureza dos complexos. A medida de condutividade molar foi efetuada utilizando-se concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ , à  $25^\circ \text{ C}$ , em diclorometano, Tabela 17.

A técnica de susceptibilidade magnética mostrou a existência de 1 elétron desemparelhado, confirmando assim a formação do complexo no estado de oxidação IV.

Tabela 17 - Dados de análise elementar e condutividade molar do complexo  $[\text{VO}(\text{GP})_2] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$

Complexos	Análise elementar		Condutividade molar ( $\mu\text{s/cm}$ )	
	% C	% H		
$[\text{VO}(\text{GP})_2] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$	48,6	4,5	1,509	neutro
	(49,2)	(4,2)	(0,406) <sup>2</sup>	

Fonte: Do Autor.

<sup>1</sup> Para análise elementar os resultados entre parênteses são teóricos.

<sup>2</sup> Para a condutividade molar os resultados entre parênteses referem-se ao branco.

## 6 CONCLUSÃO

Há poucos estudos na literatura sobre o tema tratado neste trabalho para espécie de *Caesalpinia* var. *peltophoroides*, trazendo resultados inéditos para esta representante do gênero *Caesalpinia*, elucidando sua potencialidade biofarmacológica quanto aos testes realizados.

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu, demonstraram que o extrato bruto e suas respectivas partições de raízes *Caesalpinia* var. *peltophoroides* é rica em compostos fenólicos, mostrando concentrações significativas.

O estudo da antioxidante das raízes *Caesalpinia* var. *peltophoroides* demonstrou que o extrato bruto, e as partições acetato e butanólica apresentou um ARSL próximo do padrão AA, o que torna interessante o posterior trabalho no sentido de isolamento dos constituintes existentes nessas frações e a posterior realização dos testes farmacológicos.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o biflavonóide (5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona), isolado em um trabalho anterior por Zanin, 2012, e também presente e isolado neste trabalho, apresentou uma boa capacidade de resposta ao tratamento (valor de  $IC_{50} = 48 \pm 1,60 \mu M$ ), para linhagem de HCT. Quando as células de HTC foram tratadas sob as mesmas condições, com o cisplatina, um potente agente anticâncer, o valor de  $IC_{50}$  encontrado foi de  $32,53 \pm 1,49 \mu M$ . Os resultados indicam que Caesalpinioflavona tem uma potencial atividade antiproliferativa em células HTC.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o galato de propila foi eficaz na redução da viabilidade das células de uma forma dependente da concentração em todas as linhas celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U251), em concentrações superiores a  $50 \mu g/mL$ . Dentre as linhagens celulares estudadas, as linhagens de células (MCF-7) e (U251) foram as que apresentaram maior capacidade de resposta ao tratamento apresentando um valor de  $IC_{50} = 236,4 \pm 25.3 \mu M$  e  $IC_{50} = 228,9 \pm 27.37 \mu M$  respectivamente.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o  $[RuCl_2(GP)(dppb)]$  foi eficaz na redução da viabilidade das células de uma forma dependente da concentração em todas as linhas celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U25),

a partir de 50 µg/mL. Dentre as linhagens celulares estudadas, as linhagens de células (A549) e (U251) foram as que apresentaram maior capacidade de resposta ao tratamento apresentando um valor de  $IC_{50} = 65.46 \pm 7.1 \mu M$  e  $IC_{50} = 52.1 \pm 3.0 \mu M$  respectivamente, sendo que a última apresentou uma diminuição da sua atividade inibitória após o aumento dessa concentração, comportamento inverso ao das demais linhagens. Os valores de  $IC_{50}$  deste ensaio foram comparados com os resultados de viabilidade celular do galato de propila, com intuito de avaliar a otimização da atividade antiproliferativa após a complexação com o precursor metálico. A partir dessa comparação foi possível concluir que houve um aumento na atividade inibitória sobre as linhagens (A549), (HepG2) e (U251), evidenciando que houve um aumento da atividade antiproliferativa, no composto GP após a coordenação com o precursor metálico.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o  $[VO(GP)_2]$  foi eficaz na redução da viabilidade das células de uma forma dependente da concentração em todas as linhas celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U251O) a partir de 25 µg/mL. Dentre as linhagens celulares estudadas, as linhagens de células A549, HepG2 e U251 foram as que apresentaram maior capacidade de resposta ao tratamento apresentando um valor de  $IC_{50} = 17.31 \pm 0.11 \mu M$ ,  $IC_{50} = 19.12 \pm 0.15 \mu M$  e  $IC_{50} = 24.03 \pm 0.21 \mu M$  respectivamente. Esses valores foram muito próximos aos valores de  $IC_{50}$  do cisplatina um potente agente anticâncer, evidenciando que o composto apresenta um grande potencial anti-proliferativo. Os valores de  $IC_{50}$  deste ensaio também foram comparados com os resultados de viabilidade celular do galato de propila, com intuito de avaliar a otimização da atividade antiproliferativa após a complexação com o precursor metálico. A partir dessa comparação foi possível concluir que houve um aumento na atividade inibitória sobre todas as linhagens estudadas, evidenciando que houve um aumento da atividade antiproliferativa, no composto GP após a coordenação com o precursor metálico.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o  $[Pt(GP)(PPh_3)_2]$  não foi eficaz na redução da viabilidade das células em nenhuma das linhas celulares estudadas (A549, MCF7, HepG2 e U251).

## REFERÊNCIAS

- AIRD, R. E. et al. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. **Br. J. Cancer**, v.86, n.10, p.1652, 2002.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed – Bookman, 2010. p. 597.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos específicos e não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- BARBOSA, M. I. F. **Complexos carbonílicos de rutênio. De um gás tóxico a uma droga com potencial agente citotóxico**. 2007. 129 f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) - Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- BELTRÃO-BRAGA, et al. moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. **WAITZBERG DL. Dieta, nutrição e câncer**, v. 1, p. 79-87, 2004.
- BENITE, A.M. C; MACHADO, P.S; BARREIRO, E.J. Considerações sobre a química bioinorgânica medicinal. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.
- BERGAMO, A. et al. Ruthenium-based NAMI-A type complexes with in vivo selective metastasis reduction and in vitro invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity. **Intern. J. Oncology**, v. 21 n.6, p.1331, 2002.
- BERGAMO, A. et al. Inhibitory Effects of the Ruthenium Complex KP1019 in Models of Mammary Cancer Cell Migration and Invasion. **Metal-Based Drugs**. 2009:1, 2009.
- BERGAMO, A. et al. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidat. **J. Inorg. Biochem.**, v.106 n.1, p.90, 2012.

BRAZ-FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates*, v. 9, n. 3, p. 111-122, 2006.

CHANDRAMOHAN REDDY, T. et al. Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF- $\kappa$ B inactivation. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 3, p. 396-405, 2012.

CHEN, H. M. et al. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: Novel recognition mechanisms. **J. Amer. Chem. Soc.**, v.125, n. 1, p.173, 2003.

CHEN, H .M. et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. **Cancer letters**, v. 286, n. 2, p. 161-171, 2009.

CHEN, T. et al. Ruthenium Polypyridyl complexes That Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells. **Inorg. Chem.**, v. 49 n. 14, p. 6366, 2010.

CHEN, Ching-Hsein. et al. Role of redox signaling regulation in propyl gallate-induced apoptosis of human leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 494-501, 2011.

CLARKE, M. J.; ZHU, F.; FRASCA, D. R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99 n. 9, p. 2511, 1999.

CLARKE, M. J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". **Coord. Chem. Rev.**, v. 236 n.1, p. 209, 2003.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CORY, ANN H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer communications**, v. 3, n. 7, p. 207-212, 1991.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.

CUEVAS, O. A. et al. Química Inorgânica Medicinal: vanádio, platino, oro. **Educación química**, v. 23, n. 1, p. 33-40, 2012.

DOUGAN, S. et al. Phenylazopyridine and phenylazo-pyrazole chlorido ruthenium (II) arene complexes: arene loss, aquation, and cancer cell cytotoxicity. **Inorg. Chem.**, v. 45, n. 26, p. 10882, 2006.

EMBRAPA FLORESTAS. **Sibipiruna (*Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*)**

Disponível em:

<[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies\\_arboreas\\_brasileiras/arvore/CONT000fu1aqjv302wyiv807nyi6scjx0ro9.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000fu1aqjv302wyiv807nyi6scjx0ro9.html)> Acesso em 15/mar/2012.

ESPIN, J.C. et al. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1588-1592, 2000

FIUZA, S. M. et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 13, p. 3581-3589, 2004.

FRAUSIN, F. et al. Free exchange across cells, and Echistatin-sensitive membrane target for the metastasis inhibitor NAMI-A (imidazolium trans-Imidazole Dimethyl

Sulfoxide Tetrachlororuthenate) on KB tumor cells. **J. Pharm. Exp. Therap.**, v. 313, n. 1, p. 227, 2005.

GRAF, N.; LIPPARD, S.J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** v. 64, n. 11, p. 993, 2012.

HAN, Y. H.; PARK, W.H. Propyl gallate inhibits the growth of HeLa cells via regulating intracellular GSH level. **Food and chemical toxicology**, v. 47, n. 10, p. 2531-2538, 2009.

HAN, Y. H. et al. Propyl gallate inhibits the growth of HeLa cells via caspase-dependent apoptosis as well as a G1 phase arrest of the cell cycle. *Oncology reports*, v. 23, n. 4, p. 1153, 2010.

HAN, Y. H. et al. Propyl gallate inhibits the growth of calf pulmonary arterial endothelial cells via glutathione depletion. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 4, p. 1183-1189, 2010.

HO, HSIEH-HSUN et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- $\kappa$ B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8, p. 2508-2516, 2010.

HSU, Jeng-Dong et al. Gallic acid induces G2/M phase arrest of breast cancer cell MCF-7 through stabilization of p27Kip1 attributed to disruption of p27Kip1/Skp2 complex. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1996-2003, 2011.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chem Rev.** v. 99, n. 9, p.2467, 1999.

JAKUPEC, M. A. et al. Antitumour metal compounds: more than theme and variations". **Dalton Trans.** v.14, n. 2, p. 183, 2008.

JAKUPEC, M.A. et al. Redox-active antineoplastic ruthenium complexes with indazole: correlation of in vitro potency and reduction potential. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 8, p. 2831, 2005.

JUN, H. et al. Antioxidant activity in vitro of three constituents from *Caesalpinia sappan* L. *Tsinghua Sci. Technol.*, v.13, p. 474–479, 2008

JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chem. Rev.** v. 107, n. 5, p. 1387, 2007.

JUNIOR, Valdir F. et al. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KAPITZAa, S. et al. The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. **Canc. Lett.** v. 226, p. 115–121, 2005.

KINOSHITA, T. et al. The isolation and structure elucidation of new cassane diterpene-acids from *Caesalpinia crista* L. (Fabaceae), and review on the nomenclature of some *Caesalpinia* species. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 6, p. 717-720, 2005.

LEE, Young-Man et al. Isoliquiritigenin 2'-methyl ether induces growth inhibition and apoptosis in oral cancer cells via heme oxygenase-1. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 776-782, 2010.

LIANG, R. R. et al. Preferential inhibition of hepatocellular carcinoma by the flavonoid Baicalein through blocking MEK-ERK signaling. **International journal of oncology**, v. 41, n. 3, p. 969-978, 2012.

LIANG, W. et al. Gallic acid induces apoptosis and inhibits cell migration by upregulating miR-518b in SW1353 human chondrosarcoma cells. **International journal of oncology**, v. 44, n. 1, p. 91, 2014.

LIU, H. K. et al. Diversity in guanine-selective DNA binding modes for an organometallic ruthenium arene complex, **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 45, n. 48, p. 8153, 2006.

LOCATELLI, C. et al. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 60, p. 233-239, 2013.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALINA, J. et al. Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 6, n. 4, p. 434, 2001.

MASSEY, A. J.; SCHOEPFER, J.; BROUGH, P. A. et al. "Preclinical Antitumor Activity of the Orally Available Heat Shock Protein 90 Inhibitor NVP-BEP800". **Mol. Cancer. Ther.** v. 9, p. 906, 2010.

MILANI, Liana Inês Guidolin et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Rama Forte) extracts. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 2, p. 118-124, 2012.

MONNERET, C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. **Ann. Pharm. Fr.** v. 69, n. 6, p. 286, 2011.

MURA, P. Synthesis, Structural Characterization, Solution Chemistry, and Preliminary Biological Studies of the Ruthenium(III) Complexes [TzH][trans-RuCl<sub>4</sub>(Tz)<sub>2</sub>] and [TzH][trans-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Tz)].(DMSO), the Thiazole Analogues of Antitumor ICR and NAMI-A. **Inorg. Chem.**, v. 43, n. 13, p. 3863, 2004.

MORRIS, R. E. et al. Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes". **J. Med. Chem.**, v. 44, n. 22, p. 3616, 2001.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer. **Rev. Virtual Quim.** v. 3, n. 3 p. 196, 2011.

NISHANT, Shinde et al. Anticancer study on alcoholic extract of caesalpiniaacrista root bark extract. **Journal of Pharmaceutical Research and Opinion**, v. 1, n. 4, 2011.

NOVAKOVA, O.; Correlation between cytotoxicity and dna-binding of polypyridyl ruthenium complexes. **Biochemistry**, v. 34, n. 38 p. 12369, 1995.

NOZAKI, Hiroshi et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290-8292, 2007.

PEREIRA, Juliana et al. Papel da célula endotelial em neoplasias malignas hematológicas. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 30, n. 3, p. 223-228, 2008.

PIZARRO, A.M.; SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochim.**, v. 91, n.10, p.1198, 2009.

RADEMAKER-LAKHAI, J. M. et al. A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSOimidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clinic. Cancer Res.**, v. 10, n.11, p. 3717, 2004.

ROMERA, S. Complexos de Cobre (II) e Oxovanádio (IV) com Bases de Schiff Quirais : Preparação , Caracterização e Alguns Ensaios Catalíticos Sandra Romera 2007 Tese de doutorado, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos,

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coord. Chem. Rev.**, v. 251 n. 13-14, p.1633, 2007.

SAVA, G. et al. Sulfoxide ruthenium complexes: non toxic tools for the selective treatment of solid tumour metastases. **Topics in Biological Inorganic Chemistry**, v. 1 "Metallo-pharmaceuticals", M. J. Clarke and P. J. Sadler eds., Springer, Berlin, p. 143-169, 1999.

SAVA, G.; BERGAMO, A. Ruthenium-based compounds and tumour growth control (Review). **Int. J. Oncol.**, v. 17, n. 2, p. 353, 2000.

SERRANO, A. et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 350, n. 1, p. 49-54, 1998.

SIJA, E.; et al. Solution equilibrium studies of anticancer ruthenium(II)-6-p-cymene complexes of pyridinecarboxylic acids". **Polyhedron**, p. 67-51, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. & MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. p. 299

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC–Livros Técnicos e Científicos, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento: Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. 6.ed. Porto Alegre: UFGRS/UFSC, 2007. p. 291-320

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, C. M.; et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007

UDENIGWE, C. C.; ATA, A.; SAMARASEKERA, R. Glutathione S-transferase inhibiting chemical constituents of *Caesalpinia bonduc*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 55, n. 3, p. 442-445, 2007.

VACCARO, M.; et al. Lipid based nanovectors containing ruthenium complexes: a potential route in cancer therapy. **Chem. Commun.** v. 21 n. 11 p. 1404, 2009.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of natural products**, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A.. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473-485, 2013.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.** v. 36, n. 3, p. 165-175, 2003.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.** v. 36, n. 3, p. 131-49, 2003.

VIEGAS JR. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WANG, F.; et al. Competitive reactions of a ruthenium arene anticancer complex with histidine, cytochrome c and an oligonucleotide. **J. Biol. Inorg. Chem.** v. 10, n. 2 p. 147, 2005

WALLACE B. MORRISON. **Cancer in dogs and cats: Medical and Surgical management** 2.ed. Hong-Kong: Tetonnm, 2002. p. 31-37 e 185

WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. **Chem. Rev.** v. 99, n.9, p. 2451, 1999.

YAN, Y.K. et al. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. **Chem. Comm.** v. 14, n. 38, p. 4764, 2005.

YANG J. et al. Casticin-induced apoptosis involves death receptor 5 upregulation in hepatocellular carcinoma cells. **World J Gastroenterol.** v. 14; 17, n. 38, p. 4298–4307, 2011.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed tests and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **LWT – Food and Science Technology.** v. 38, p. 193-200, 2005.

YOU, Bo Ra. et al. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1334-1340, 2010.

YOU, Bo Ra. et al. Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 357, n. 1-2, p. 295-303, 2011.

YOU, Oh, Kim, SH. et al. Ginkgetin induces apoptosis via activation of caspase and inhibition of survival genes in PC-3 prostate cancer cells. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 23, n.9, p. 2692-2695, 2013

ZAMBLÉ, A. et al. Vasoactivity, antioxidant and aphrodisiac properties of *Caesalpinia benthamiana* roots. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 116, p. 112–119, 2008.

ZANIN, J.B. **ESTUDO QUÍMICO E BIOPROSPECÇÃO DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*.** Dissertação de mestrado, 2012 (Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.

ZANIN, J. B., DE CARVALHO , B. A. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (*Caesalpiniaceae*): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, 17, 7887-7902, 2012.