



SÍNTESE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS METÁLICOS DE 2-(2'-HIDROFENIL)BENZAZÓIS

Thaygra S. Bernardes - Acadêmica do Curso de Química Industrial / ULBRA

Dione S. Corrêa - Professora do Curso de Química e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada / ULBRA

Resumo

O câncer é um processo multifásico que se desenvolve ao longo do tempo. Esta doença surge como uma consequência da desregulação do ciclo celular, resultando numa perda progressiva da diferenciação celular e num crescimento celular descontrolado. A origem deste fenômeno é multifatorial, compreendendo vários fatores, entre os quais, ambientais (produtos químicos, exposição à radiação UV, radiação ionizante ou à luz solar), modo de vida (alimentação, consumo de bebidas alcoólicas, uso de drogas ou de tabaco), assim como fatores genéticos e hereditários. As células cancerígenas divergem das células normais em várias características, como perda de diferenciação, aumento da capacidade de invasão e diminuição da sensibilidade a drogas. Além disso, podem ocorrer diferentes alterações cromossômicas, como a perda ou ganho de cromossomas, mudanças na ploidia ou aberrações estruturais. A grande maioria dos agentes anti-cancerígenos atua inibindo as mitoses, interferindo com o metabolismo dos ácidos nucleicos ou promovendo distúrbios específicos nos processos bioquímicos, como a inibição de reações enzimáticas chaves. O interesse em química de coordenação está aumentando continuamente com a preparação de ligantes orgânicos contendo grupos doadores de elétrons e ainda maior quando o ligante tem importância biológica. Benzazóis substituídos na posição dois e seus derivados fazem parte da classe de compostos biológicos ativos, possuindo um amplo espectro de atividades. Os núcleos benzazóis 2-substituídos estão associados com diversas atividades farmacológicas, tal como antifúngicas, antibacteriana, anticâncer, antiviral, anti-inflamatória. Complexos metálicos destes ligantes têm sido alvo de vários estudos. Assim, este estudo visa a síntese de novos complexos com ligantes benzazólicos, de forma a expandir a gama de compostos com estas características, e realizar experimentos de citotoxicidade em diferentes linhas de células tumorais. As células foram incubadas com os compostos em diferentes concentrações, onde os três complexos com os metais cobalto e zinco obtidos apresentaram resultados propícios para ação sobre tais células.

Palavras-chave: Benzazóis. Complexos metálicos. Atividade antitumoral.

Introdução

Compostos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis são moléculas fluorescentes (Figura 1) que exibem grande deslocamento de Stokes e elevada estabilidade térmica e fotofísica, devido ao mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (TPIEE). Estes compostos têm sido estudados como corantes laser (CAMPO et al., 2000), como estabilizadores de polímeros da luz UV (RODEMBUSCH et al., 2005), como novos materiais orgânicos (RODEMBUSCH et al., 2005) e, além disso, têm sido incorporados em materiais poliméricos orgânicos e inorgânicos (COSTA et al., 2001).

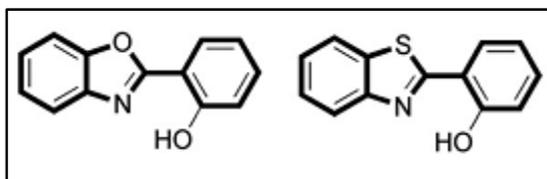


Figura 1 - Compostos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis

O mecanismo de TPIEE de 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazóis (HBO) foi estudado em condições fisiológicas utilizando absorção e espectroscopia de emissão de estado estacionário e inibição da TPIEE via coordenação de metal, mostrando uma significativa mudança de comprimento de onda. Tem sido proposto que HBO apresentam mimetização estrutural par base DNA na qual tautomerismo pode ser iniciado em um tempo definido e posicionado com dupla DNA. A espécie HBO está também presente em um número de íons metálicos quelatos sintéticos: um produto natural bis(benzoxazol) (UK-1) também possuindo este grupo foi avaliado por apresentar atividade anticâncer e estudos ligando a um íon metálico indicam que UK-1 é capaz de se ligar a uma variedade de íons metálicos biologicamente importantes.

As numerosas aplicações de HBO permitem compreender a síntese de compostos da família dos benzazóis diferentemente substituídos e o estudo do efeito do íon metal ligante, como também a avaliação da atividade vitroantitumoral dos complexos metálicos. Embora a afinidade de ligação a íons metálicos, por si só não prediz citotoxicidade dentro da série de 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazóis, a capacidade destes compostos para se ligarem ao DNA na presença de íons metálicos está correlacionada com a citotoxicidade. Com base nas considerações sobre esta família

de compostos, uma nova série de compostos que exploram a influência sobre a ligação de íons metálicos e citotoxicidade de diferentes derivados, mantendo o núcleo benzoxazol e 2-(2'-hidroxifenil) substituinte foram preparados.

O presente trabalho centra-se no estudo do efeito de diferentes ligantes benzazóis sobre a atividade contra linhas de células cancerosas, bem como correlacionar a ligação do metal com a citotoxicidade dos compostos benzazol, estudando a afinidade dos análogos benzazóis por vários íons metálicos divalentes, como Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} .

Material e Métodos

Os procedimentos de síntese e caracterização foram conduzidos no Laboratório 505 da Central de Laboratórios (Prédio 19) e no Centro de Pesquisa em Produto e Desenvolvimento (CEPPED), ambos na Universidade Luterana do Brasil (ULBRA /Canoas). Os ensaios citotóxicos foram realizados no Laboratório de Biologia do Câncer do Prédio 22, também na Universidade Luterana do Brasil.

Síntese dos Ligantes Benzazóis

Os compostos heterocíclicos deste estudo foram sintetizados através de reações de condensação entre derivados carboxílicos aromáticos substituídos com anilinas funcionalizadas em presença de um agente de desidratação, conforme a Figura 2:

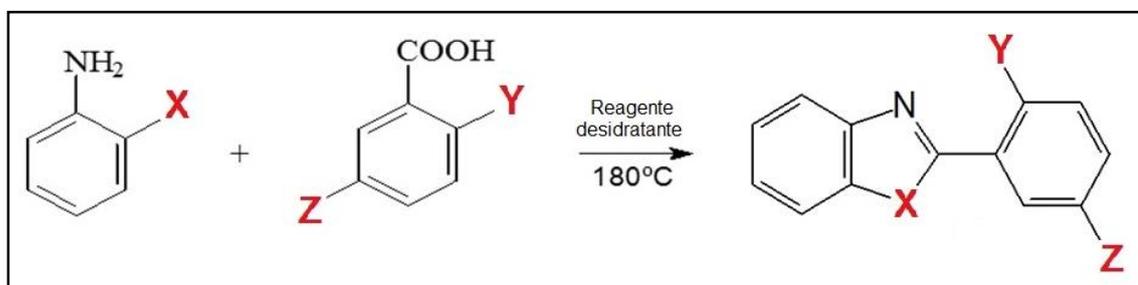


Figura 2 - Reação de obtenção dos ligantes benzazóis

Em um balão foram adicionados o derivado carboxílico aromático substituído com a anilina funcionalizada em ácido polifosfórico (APF). A mistura foi aquecida à temperatura de 180°C e mantida por 4h sob agitação. Depois de resfriada a mistura reacional foi vertida em água gelada e o precipitado foi filtrado, neutralizado com uma solução de bicarbonato de sódio, lavado e seco.

Todas as reações de síntese foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando sílica-gel sobre placas de alumínio, usando gradientes de solventes adequados para cada etapa e observação das manchas sob luz ultravioleta. Para a purificação foi empregada a cromatografia em coluna de sílica gel via seca, utilizando diclorometano como eluente.

Os compostos foram caracterizados pelo emprego de técnicas espectroscópicas. Para confirmação do produto obtido, empregaram-se as técnicas de ponto de fusão e RMN-¹H. A avaliação de absorvância foi realizada através de espectrofotometria de varredura no UV/VIS entre 280 e 400nm.

Complexação com Íons Metálicos

A complexação com os metais consistiu na reação do ligante benzazólico com um sal inorgânico do metal, resultando no complexo metálico M(HBO)₂, conforme Figura 3:

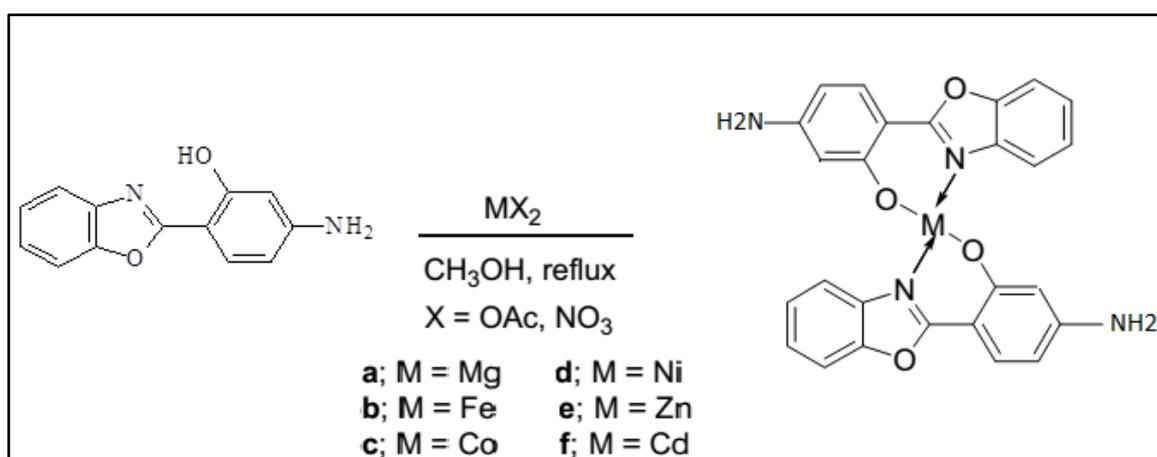


Figura 3 - Reação de complexação do ligante benzazol com sal metálico

O ligante benzoxazol foi solubilizado em um balão com diclorometano. O sal metálico foi previamente solubilizado em um erlenmeyer com diclorometano e adicionado gota a gota ao balão sob agitação. A reação ocorreu em 24h e ao término desta, verteu-se o conteúdo do balão em uma cápsula de porcelana e deixou-se secar ambiente. Após a secagem, adicionou-se à cápsula de porcelana diclorometano para lavagem, retirando-se em seguida o solvente, deixando-se o precipitado apenas. Este precipitado foi seco à vácuo para obtenção do produto final. Os sais inorgânicos empregados foram dos íons metálicos Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} .

Linhagem Celular e Ensaio Citotóxico

Foram utilizadas as linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongo, adquirida do RJC Collection, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), HT-29 (carcinoma de intestino humano, adquirida do American Type Culture Collection, EUA), H460 (carcinoma de pulmão humano, adquirida do American Type Culture Collection, EUA), MCF-7 (carcinoma de mama humano, adquirida do American Type Culture Collection, EUA) e U251 (glioblastoma multiforme humano adquirida do American Type Culture Collection, EUA).

As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² com meio de cultura Dulbecco's contendo 10% de soro fetal bovino (v/v), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de no mínimo 95%. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT ((3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)). Culturas em triplicatas foram expostas por 24 h aos compostos em doses seriadas variando de 0 a 100µL. Após os tratamentos, as células foram incubadas com 100µL de solução de MTT (5 mg/mL de MTT) em meio de cultura sem soro fetal bovino e sem fenol, a 37°C por 4 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e os cristais foram solubilizados em 200µL de DMSO e quantificados em um leitor de microplacas (Multiskan, UNISCIENCE), em densidade óptica de 540nm.

Tabela 1: Classificação de citotoxicidade de materiais com estratificação dos níveis de viabilidade celular em porcentagem segundo categorias de toxicidade dos materiais do documento ISO 10993-5 (1999)

Viabilidade celular (%) *	
<i>Citotoxicidade</i>	<i>Faixa</i>
não-citotóxico (NT)	> 90
levemente citotóxico (LT)	80 a 89
moderadamente citotóxico (MT)	50 a 79
severamente citotóxico (ST)	< 50

*porcentagem em relação ao controle negativo (meio de cultura)

A citotoxicidade dos complexos metálicos de 2-(2'-hidroxifenil)benzazol foi testada usando o ensaio na linha celular de câncer da mama, intestino, cérebro e a linha celular do câncer de pulmão.

Resultados e Discussão

Os ligantes benzazóis foram previamente avaliados e caracterizados para as reações de complexação. Os complexos metálicos obtidos, além da caracterização, foram avaliados quanto a citotoxicidade.

Ligantes Benzazóis

Através de reações de condensação entre derivados carboxílicos aromáticos substituídos com anilinas funcionalizadas, obtiveram-se dois derivados 2-(amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol com rendimentos superiores a 70%. Todas as propriedades físicas e espectroscópicas (PF, UV, RMN) destes compostos foram avaliadas e estavam de acordo com a estrutura. Para fins comparativos, as Figuras 4 e 5 apresentam os espectros de referência dos ligantes antes da complexação:

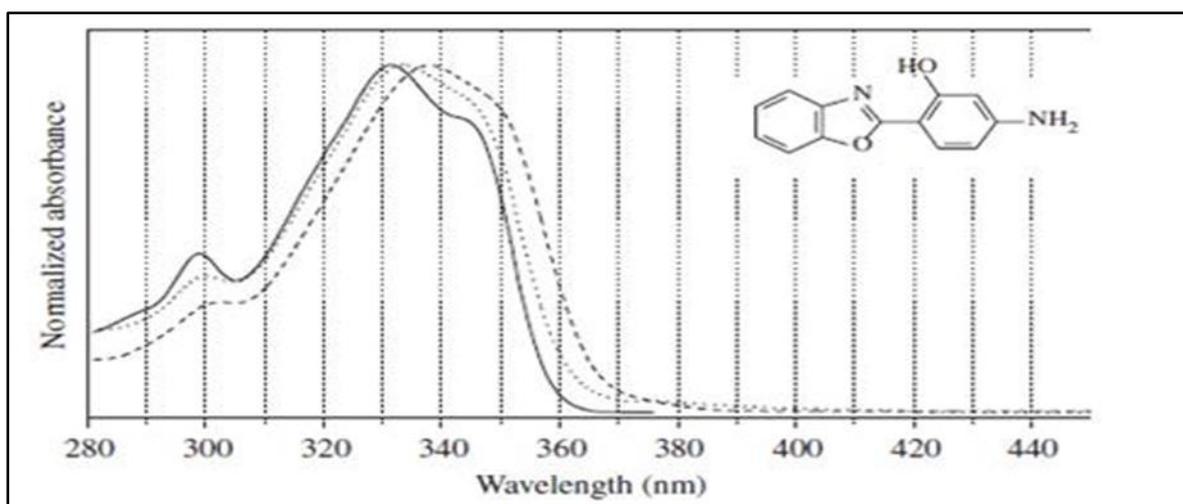


Figura 4 - Espectro de referência 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol

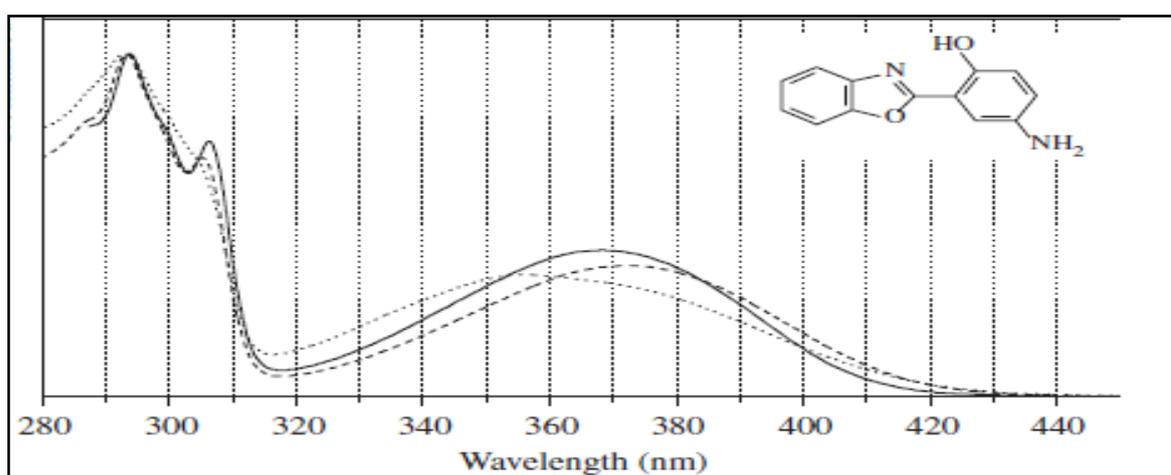


Figura 5 - Espectro de referência 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol

Complexos Metálicos

Os sais inorgânicos empregados foram dos íons metálicos Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} .

As reações com os sais de Mg^{2+} e Ca^{2+} não ocorreram, pois durante o tempo de reação não se observou a formação de produtos. O complexo formado com o cobre não pode ser avaliado quanto a citotoxicidade, pois não foi possível solubilizar o composto.

O complexo de cobalto, com ligante possuindo um grupo amino na posição 4' do anel fenólico foi obtido com rendimento de 5,3%, na cor amarelo pálido. O composto se mostrou solúvel em dimetilsulfóxido com ponto de fusão em 305-310°C. Já o complexo de cobalto, com ligante possuindo um grupo amino na posição 5' do anel fenólico foi obtido com rendimento de 57,4%, na cor verde escuro. O composto se mostrou solúvel em dimetilsulfóxido e pouco solúvel em diclorometano com ponto de fusão em 325-330°C.

O complexo de zinco, com ligante possuindo um grupo amino na posição 5' do anel fenólico foi obtido com rendimento de 50,7%, na cor verde escuro. O composto de mostrou solúvel em dimetilsulfóxido e pouco solúvel em diclorometano com ponto de fusão 315-320°C.

Para varredura no UV-VIS, os complexos foram solubilizados em DMSO. As Figuras 6, 7 e 8 mostram os espectros obtidos para os dois complexos de cobalto e complexo de zinco:

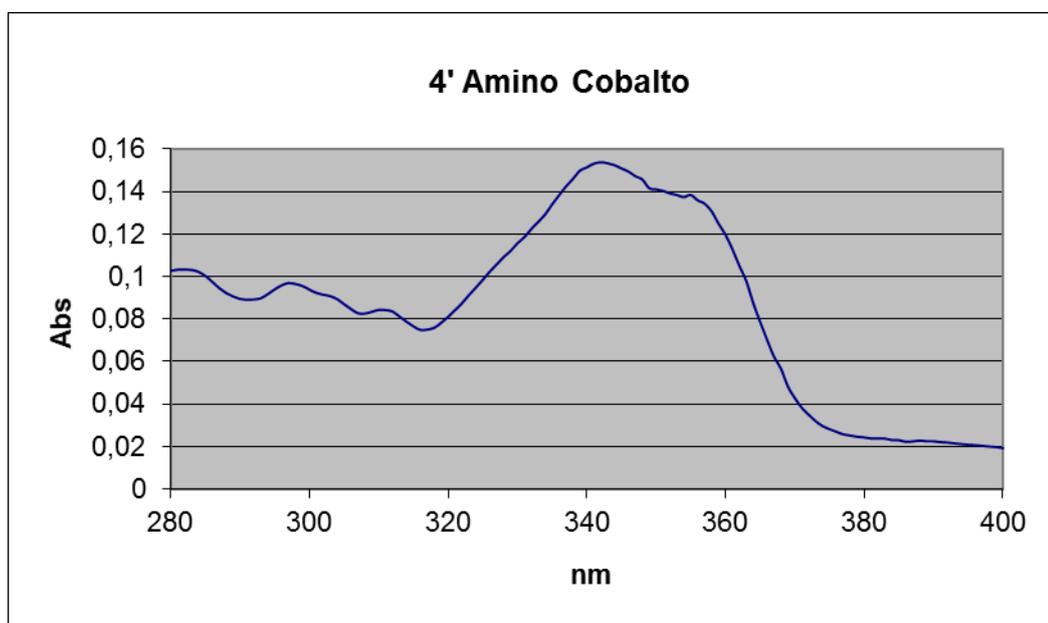


Figura 6 - Espectro UV-VIS para o complexo de 4' amino cobalto

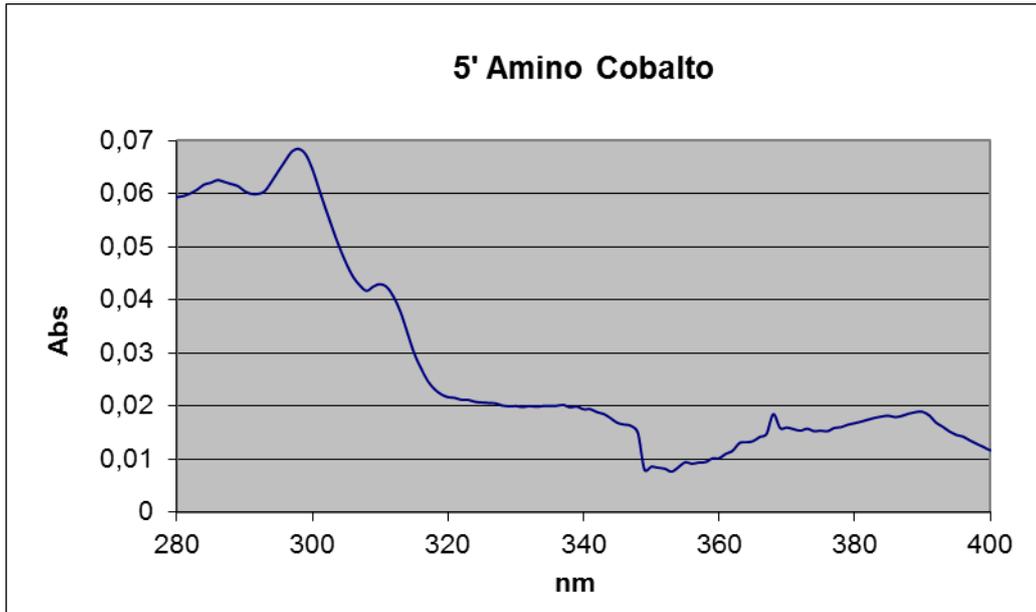


Figura 7 - Espectro UV-VIS para o complexo de 5' amino cobalto

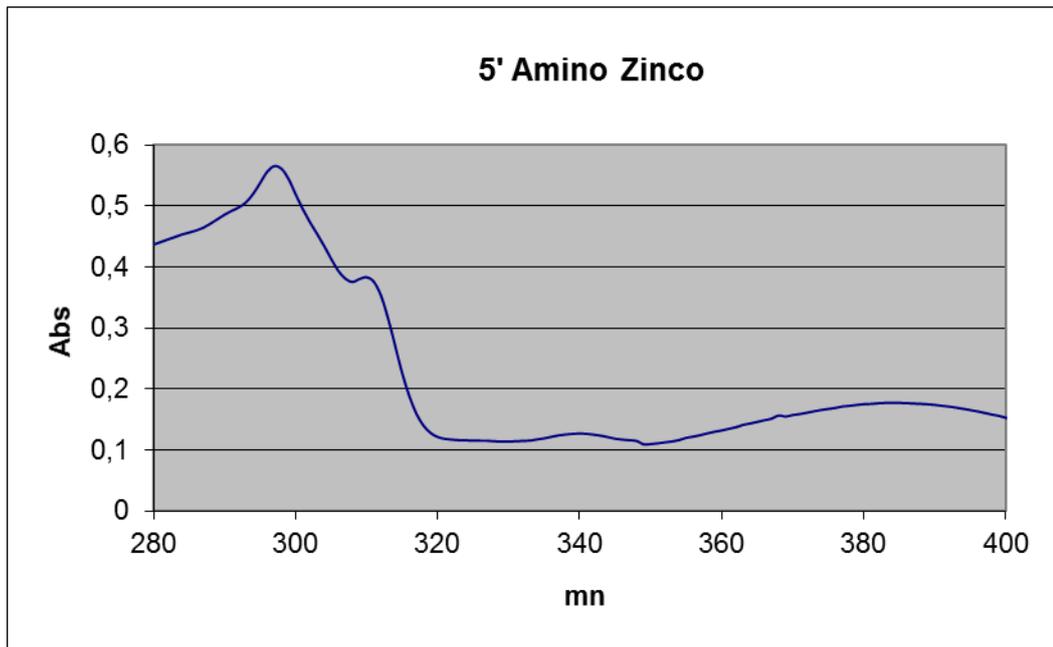


Figura 8 - Espectro UV-VIS para o complexo de 5' amino zinco

Linagem Celular e Ensaio Citotóxico

Os compostos foram testados nas seguintes concentrações: 0, 2, 5, 10, 20, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não foi possível solubilizar por completo, ficando depósito no fundo da placa.

Foram realizados 3 experimentos independentes, cada um em triplicata. A citotoxicidade avaliada como ideal foi a de “Moderadamente citotóxico”, pois acima disto há a possibilidade de se atingir, além das células cancerosas, as células saudáveis.

Tabela 2: Resultados de citotoxicidade para as linhagens celulares avaliadas

	Levemente citotóxico	Moderadamente citotóxico	Severamente citotóxico
L929		4' Co e 5' Zn (dose de 10 - 30 ug/mL)	4' Co e 5' Zn (dose de 50 ug/mL)
HT-29	5' Co (dose de 10-30 ug/mL)	5' Zn e 4' Co (dose de 10- 30 ug/mL)	5' Co, 5' Zn e 4' Co (dose de 50 ug/mL)
H-460		4' Co (dose de 10- 30 ug/mL) 5'Zn (dose de 50 ug/mL) 5' Co (dose de 20- 50 ug/mL)	4' Co (dose de 50 ug/mL)
MCF-7	4' Co (dose de 5 ug/mL) 5' Zn (dose de 5-20 ug/mL) 5' Co (dose de 10-30 ug/mL)	4' Co (dose de 10- 50 ug/mL) 5' Zn (dose de 30- 50 ug/mL) 5' Co (dose de 50 ug/mL)	
U-251	4' Co (dose de 5 a 20 ug/mL) 5' Co (dose de 10 a 30 ug/mL)	4' Co (dose de 30- 50 ug/mL) 5' Co (dose de 50 ug/mL)	5' Zn (dose de 5 a 50 ug/mL)

Observa-se que os três complexos metálicos apresentaram resultados positivos para citotoxicidade. O complexo 4' amino cobalto apresentou resultado satisfatório em todas as linhagens celulares. O complexo 5' amino cobalto apresentou resultado satisfatório nas linhagens H-460, MCF-7 e U-251. O complexo 5' amino zinco apresentou resultado satisfatório nas linhagens L929, HT-29, H-460 e MCF-7.

Conclusões

Os resultados alcançados demonstraram o efeito dos diferentes ligantes benzazóis complexados com metais divalentes sobre a atividade contra linhas de

células cancerosas. Obtiveram-se três complexos com os metais cobalto e zinco que apresentaram resultados propícios para ação sobre tais células.

Agradecimentos

PROPESQ / ULBRA; CEPED / ULBRA; LNMO-IQ / UFRGS.

Referências Bibliográficas

CARDOSO, M.B., SAMIOS, D., SILVEIRA, N.P., RODEMBUSCH, F.S., STEFANI, V. **ESIPT-exhibiting protein probes: a more sensitive alternative to the biuret colorimetric test in the rice proteins detection.** Photochem. & Photobiol. Sci., 6, 99-102 (2007).

CORBELLINI, V.A., SCROFERNEKER, M.L., CARISSIMI, M., RODEMBUSCH, F.S., STEFANI, V. **A fast and cost-effective methodology for *Fonsecaea pedrosoi* ATCC46428 staining using ESIPT fluorescent dyes.** J. Photochem. Photobiol B: Biology, 99, 126-132 (2010).

CORREA, D.S. **Preparação de novos materiais poliméricos, fluorescentes por transferência protônica intramolecular, com interesse na geração estimulada de radiação (LASER), e em estudos fotofísicos.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

FUJITA, H., FUJITA, T., SAKURATI, T., YAMASE, T., & SETO, Y. 1992. **Antitumor Activity of New Antitumor Substance, Polyoxomolybdate, against Human Cancers in Athymic Nude Mice.** The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 168: 421-426.

GARRET, M.D. 2001. **Cell cycle control and cancer.** Current Science, 81: 515-522.

GARUTI L., ROBERTI, M., PIZZIRANI, D., PESSION, A., LEONCINI, E., CENCI, V. & HRELIA, S. 2004. **Differential antiproliferative activity of new benzimidazole-4,7-diones.** Il Farmaco, 59: 663-668.

HOLLER, M.G., CAMPO, L.F., BRANDELLI, A., STEFANI, V. **Synthesis and spectroscopic characterization of 2-(2'-hydroxyphenyl) benzazole**

isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 149, 217-225 (2002).

MATOS, M.R.P.N 2001. **Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro.** Sociedade Portuguesa de Química, 85: 61-68.

RODEMBUSCH, F.S.; BRAND, F.R.; CORRÊA, D.S.; POCOS, J.C.S.;MARTINELLI, M.; STEFANI, V. **Transition metal complexes from 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole: a spectroscopic and thermogravimetric stability study.** Mater. Chem. Phys., 92, 289 (2005).

RODEMBUSCH, F. S.; LEUSIN, F. P.; MEDINA, L. F. DA C.; BRANDELLI, A.; STEFANI, V. **Synthesis and spectroscopic characterisation of new ESIPT fluorescent protein probes.** Photochem. Photobiol. Sci., 4, 254-259 (2005).

SCUDIERO, D.A., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T.H., CURRENS, M.J., SENIFF, D., BOYD, M.R. **Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.** Cancer Research, v. 48, p. 4827 - 4833, 1988.

STEFANI, V.; SOUTO A. A.; ACUNÃ, A. U.; AMAT-GUERRI, F. **Synthesis of proton-transfer fluorescent dyes: 2,5-bis(2'-benzazolyl)hydroquinones and related compounds.** Dyes and Pigments, 20, 97-107 (1992).

STEFANI, V., SCROFERNEKER, M.L., CORBELLINI, V.A., GEHLEN, G., NOBLEGA, H.G., OLIVEIRA, I.P., HELENA, M.A. **Aplicação de benzazolas como fluorocromos para análise por imagem de microorganismos.** Patente de Invenção (PI0307854-0, novembro de 2003).