

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Síntese de novos complexos de cobalto contendo híbrido de cumarina- β -
cetoéster: investigação da citotoxicidade e reatividade em solução**

Esther Saraiva Areas

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SÍNTESE DE NOVOS COMPLEXOS DE COBALTO CONTENDO
HÍBRIDO DE CUMARINA- β -CETOÉSTER: INVESTIGAÇÃO DA
CITOTOXIDADE E REATIVIDADE EM SOLUÇÃO

ESTHER SARAIVA AREAS

Sob a Orientação da Professora

Amanda Porto Neves

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A678s Areas, Esther Saraiva, 09/07/1990-
Síntese de novos complexos de cobalto contendo
híbrido de cumarina-b-cetoéster: investigação da
citotoxicidade e reatividade em solução / Esther Saraiva
Areas. - 2018.
115 f. : il.

Orientadora: Amanda Porto Neves.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,
2018.

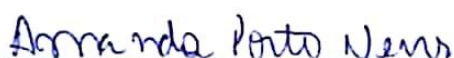
1. Complexos de cobalto. 2. cumarinas. 3. pró
fármacos biorredutíveis. I. Neves, Amanda Porto, 1983
, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTHER SARAIVA AREAS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01 / 02 / 2018



Amanda Porto Neves. Dr^a. UFRRJ
(orientadora)



Marcelo Hawrylak Herbst. Dr. UFRRJ



Maurício Lanznaster Dr. UFF

*“... i) Lembre-se de olhar para cima, para as estrelas e não para baixo, para os seus pés.
ii) Nunca desista do seu trabalho. O trabalho lhe dá sentido e propósito, e a vida é vazia sem isso.
iii) E se você for afortunado a ponto de encontrar o amor, lembre-se de que ele é raro e não o jogue fora.”*

Stephen Hawking

Dedicatória

À memória viva de Tânia Maria Saraiva, minha mãe, que me concedeu os ensinamentos mais preciosos, por me inspirar e ser o meu maior exemplo de fé.

À minha família, Andréa, Richard e Juan, que acompanharam essa trajetória acadêmica e torceram fervorosamente por cada etapa concluída.

Aos meus professores que enriqueceram meu amor pela ciência e compartilharam o conhecimento da melhor forma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Eterno por me conceder a vida e a capacidade de exercer o meu trabalho.

À minha orientadora Amanda Neves por ter dedicado tempo hábil a mim na elaboração deste trabalho, estando sempre presente, sem medir esforços para obter bons resultados e contribuindo com excelência para minha formação profissional.

À professora Aparecida Cayoco Ponzoni, que foi uma das pessoas responsáveis pela minha continuidade no curso de química e por me proporcionar o contato com uma das minhas maiores paixões atualmente, a educação.

Aos professores Marcelo Herbst e Maurício Lanznaster, que disponibilizaram tempo para participar da avaliação e contribuição deste trabalho.

Ao professor Arthur Kümmerle e seus alunos Felipe Vitório e Thiago Pereira por colaborarem com o desenvolvimento do projeto, cedendo gentilmente o derivado de cumarina.

Ao professor Guilherme Guedes pelas análises de difração de raios X e por estar sempre disponível em atender minhas dúvidas.

Ao professor Fábio Miranda e sua aluna Ana Carolina, da UFF, que me receberam com muito carinho em seu grupo de pesquisa e enriqueceram nossos resultados com as análises computacionais.

Ao professor Evelton Casartelli por se dispor em ajudar nas análises de condutividade molar e ao Técnico Maurício pelas análises de RMN.

À professora Rosane Nora, que se envolveu voluntariamente no nosso trabalho, auxiliando na investigação de problemas enfrentados em algumas sínteses.

À professora Heveline Silva da UFMG pelos ensaios de citotoxicidade dos nossos compostos e por ter me recebido com toda simpatia e atenção em seu grupo de pesquisa.

Ao professor Antônio Gerson, que sempre foi solícito em ajudar no cotidiano do laboratório e em me orientar com as discussões de eletroquímica.

À aluna de Iniciação Científica Jéssica Lohanne por ter realizado as primeiras sínteses dos complexos que foram explorados neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório 19 da UFRRJ, que enriqueceram todos os meus dias com amor e alto-astral, foram apoio nos momentos difíceis e me mostraram que qualquer comportamento louco pode ser normal se estivermos juntos.

Ao Bruno Henrique, que foi o meu maior companheiro nos últimos anos, dando força, apoio e me chamando de linda mesmo nos meus dias despenteados.

Às minhas eternas irmãs de coração, Isabela Lima e Gabriela Souza, que me acompanham desde a graduação e que são meu porto seguro.

A todos os professores que passaram pela minha vida. Vocês são as colunas que, mesmo diante de toda dificuldade, sustentam o futuro do nosso país.

Aos Laboratórios LDRX-UFF, Bio&Nano-UFF, LSAT-UFMG e LAME-UFF pelas análises realizadas neste trabalho.

Agradeço também à CAPES por me conceder a bolsa durante o período de mestrado, à FAPERJ e CNPQ, que auxiliam os projetos aprovados em nosso laboratório.

RESUMO

AREAS, Esther Saraiva. **Síntese de novos complexos de cobalto contendo híbrido de cumarina- β -cetoéster: investigação da citotoxicidade e reatividade em solução.** 2018. 115p Dissertação (Mestrado em Ciências, Química Inorgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Neste trabalho realizou-se a síntese de novos complexos de cobalto do tipo $[\text{Co}(\text{L})\text{Am}](\text{ClO}_4)_n$, onde **L** (etil 3-(7-(diethylamina)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato) é um ligante fluorescente híbrido de cumarina- β -cetoéster na forma aniônica e Am é uma amina auxiliar TPA (Tris(2-piridilmetil)amina) ou Py₂en (bis(2-piridilmetil)-1,2-diamino). A metodologia de síntese de **1b-Co^{II}**, $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{TPA}]\text{ClO}_4$, levou à formação da espécie de Co^{II}, sendo confirmado por análise elementar de CHN, condutividade molar e difração de raios X (DRX). O íon complexo **1b-Co^{II}** apresentou-se como uma espécie catiônica e hexacoordenada no estado sólido, contendo a cumarina- β -cetoéster na forma **L¹⁻** como O,O doador, e o TPA neutro como N,N',N',N' doador. Para o complexo análogo **2b-Co^{III}**, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})\text{TPA}](\text{ClO}_4)_2$, a metodologia utilizada a partir de *cis*- $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPA})\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$ levou à formação da espécie de Co^{III}, entretanto, a análise elementar de CHN e RMN de ¹H também indicaram a presença dos precursores da reação no sólido isolado. O complexo **2c-Co^{III}**, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})\text{Py}_2\text{en}](\text{ClO}_4)_2$, foi obtido partindo-se da mesma metodologia empregada para **1b-Co^{II}**, no entanto, a presença de uma amina mais básica (Py₂en) levou à formação da espécie de Co^{III}. Dados de análise elementar de CHN, condutividade molar, espectroscopia de infravermelho e RMN de ¹H apontaram para uma estrutura em que o ligante **L¹⁻** também interage com o metal através das carbonilas da porção β -cetoéster. Cálculos DFT mostraram que a banda em 448 nm no espectro de UV-Vis de **1b-Co^{II}**, obtido em tampão (pH = 7,4), é referente à transição $\pi-\pi^*$ centrada em **L¹⁻** mas para **2c-Co^{III}** a banda em 455 nm apresenta-se como uma mistura de $\pi-\pi^*$ e TCLM. Estudos de voltametria cíclica mostraram que os complexos exibem um processo quasi-reversível associado ao par Co^{III}/Co^{II}, com E_{pc} na ordem **2c-Co^{III}** < **1b-Co^{II}** < **2b-Co^{III}**, que foi associado às propriedades eletrônicas das aminas auxiliares. O maior caráter aceptor π do TPA facilita o ganho de elétrons pelo cobalto nos complexos **1b-Co^{II}** e **2b-Co^{III}**, enquanto que o Py₂en, que possui maior caráter doador σ , levou a um potencial menor para **2c-Co^{III}**. **HL** exibiu um processo catódico associado à redução de carbonila, o qual não sofreu deslocamento após a complexação. Ensaio de reatividade de **2c-Co^{III}** em solução tampão (pH 7,4) monitorados por espectroscopia de fluorescência mostraram que o ligante é liberado em presença de um agente redutor (ascorbato de sódio) durante 8,5 h, onde a liberação foi mais pronunciada em atmosfera de argônio, sugerindo que a dissociação de **L¹⁻** ocorre preferencialmente após a redução do metal. **2c-Co^{III}** apresentou-se estável em solução tampão sem agente redutor. A investigação da citotoxicidade de **HL**, **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}** contra linhagens B16-F10 (melanoma murino metastático), 4T1 (melanoma mamário murino) e BHK-21 (célula não tumoral de rim de hamister) mostraram que **HL** não foi ativo, mas a coordenação favoreceu sua citotoxicidade, na maioria dos casos. **2c-Co^{III}** exibiu melhor atividade global quando comparado com **1b-Co^{II}**, apresentando citotoxicidade seletiva às células de câncer ($45,9 \pm 5,2 \mu\text{M}$ e $39,1 \pm 6,6 \mu\text{M}$ para B16-F10 e 4T1, respectivamente) e sendo inativo contra células normais ($71,2 \pm 6,2 \mu\text{M}$).

Palavras-chave: Complexos de Cobalto, cumarinas, pró-fármaco biorredutível.

ABSTRACT

AREAS, Esther Saraiva. **Synthesis of novel cobalt complexes containing coumarin- β -ketoester hybrid: investigation of the cytotoxicity and reactivity in solution.** 2018. 115p. Dissertation (Master in Sciences, Inorganic Chemistry) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

In this work it was synthesized novel cobalt complexes of the type $[\text{Co}(\text{L})(\text{Am})](\text{ClO}_4)_n$, where **L** (ethyl 3-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-3-oxopropanoate) is a fluorescent hybrid ligand of coumarin- β -ketoester in its anionic form and Am is the auxiliary amine TPA (Tris(2-pyridylmethyl)amine) or Py₂en (bis(2-pyridylmethyl)-1,2-diamine). The synthetic procedure to obtain **1b-Co^{II}**, $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})\text{TPA}]\text{ClO}_4$, led to the formation of the Co^{II} specie, which was confirmed by CHN elemental analysis, molar conductivity and X-ray diffraction (XRD). The **1b-Co^{II}** ion complex is a cationic hexacoordinated specie in the solid state, containing the coumarin- β -ketoester in the **L¹⁻** form, acting as O,O-donor, and a neutral TPA as N,N',N',N'-donor. For analogous complex **2b-Co^{III}**, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})\text{TPA}](\text{ClO}_4)_2$, the methodology used from *cis*- $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPA})\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$ led to the formation of the Co^{III} species, however, CHN elemental analysis and ¹H NMR also indicated the presence of the precursors in the isolated solid. The complex **2c-Co^{III}**, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})\text{Py}_2\text{en}](\text{ClO}_4)_2$, was obtained from the same methodology used for **1b-Co^{II}**, however, the presence of a more basic amine (Py₂en) favored the Co^{III} specie. Elemental analysis, molar conductivity, infrared and ¹H NMR spectroscopy data indicated a structure of the type $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})(\text{Py}_2\text{en})](\text{ClO}_4)_2$, where **L¹⁻** also interacts with the metal through the carbonyl groups of the β -ketoester moiety. DFT calculations showed that the band at 448 nm in the UV-Vis spectra of **1b-Co^{II}**, obtained in buffer solution (pH 7,4), refers to the π - π^* transition centered on **L¹⁻**, and for **2c-Co^{III}** the band at 455 nm is related to a mixture of π - π^* and LMCT transitions. Cyclic voltammetry showed that the complexes exhibit a quasi-reversible process associated with the Co^{III}/Co^{II} pair, with E_{pc} in the order **2c-Co^{III}** < **1b-Co^{II}** < **2b-Co^{III}**, which was associated to the electronic properties of the auxiliary amine. The higher π -acceptor character of the TPA facilitates the electron gain by the cobalt in **1b-Co^{II}** and **2b-Co^{III}**, while Py₂en, which has a larger σ -donor character, leads to a lower potential for **2c-Co^{III}**. **HL** exhibits a cathodic process associated to the reduction of the carbonyl groups, which did not shift after coordination. Reactivity assays of **2c-Co^{III}** in buffer solution (pH 7,4) monitored by fluorescence spectroscopy indicated that the ligand was released in the presence of a reducing agent (sodium ascorbate) for 8.5 h, which was most pronounced in argon atmosphere, suggesting that dissociation of **L¹⁻** occurs preferentially after reduction of the metal. **2c-Co^{III}** was stable in buffer solution without reducing agent. The cytotoxicity investigation of **HL**, **1b-Co^{II}** and **2c-Co^{III}** against B16-F10 (metastatic murine melanoma), 4T1 (murine mammary melanoma) and BHK-21 (non-tumor cell of hamster kidney) showed that the free ligand was not active, but the coordination favored its cytotoxicity in most cases. **2c-Co^{III}** exhibited the best overall activity when compared to **1b-Co^{II}**, presenting selective cytotoxicity to cancer cells ($45.9 \pm 5.2 \mu\text{M}$ e $39.1 \pm 6.6 \mu\text{M}$ para B16-F10 e 4T1, respectively) and being inactive against normal cells ($71.2 \pm 6.2 \mu\text{M}$).

Keywords: Cobalt complexes, coumarins, bioreductive prodrugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação geral dos complexos de cobalto que se deseja obter neste trabalho, onde: (a) refere-se ao complexo de Co^{III} contendo o TPA, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})(\text{TPA})]^{2+}$ e (b) ao complexo de Co^{III} contendo o Py_2en , $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})(\text{Py}_2\text{en})]^{2+}$	18
Figura 2: Representação de um tumor sólido com região de hipóxia (entre 5 e 10 mmHg de O_2) e necrose. (Figura: BUSTAMANTE, et al., 2009 [31]).....	21
Figura 3: Esquema genérico representativo da dissociação de um ligante citotóxico após a redução do Co^{III} para Co^{II} em um complexo, considerando-se a substituição por moléculas de água, e ilustrando o equilíbrio de reoxidação do metal sendo favorecido pela presença de oxigênio.	23
Figura 4: Estrutura simples de uma cumarina (1-benzopirran-2-ona).....	24
Figura 5: Derivados de cumarina usados clinicamente [66]. O núcleo cumarínico está destacado em vermelho.	25
Figura 6: Molécula de Novobiocin e suas modificações estruturais [70].	26
Figura 7: Estrutura da umbeliferona, 7-hidroxycumarina.....	27
Figura 8: Representação das estruturas dos complexos de Co^{III} estudados por Yamamoto [9], onde $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H}$ para 1 ; $\text{R}_1 = \text{COOH}, \text{R}_2 = \text{H}$ para 2 ; $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{COOH}$ para 3 ; $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{COOH}$ para 4	28
Figura 9: Complexo de Co^{III} contendo TPA e <i>Marimastat</i> (5) como ligante citotóxico reportado por Files [83].	30
Figura 10: Complexos reportados por Bonniticha [44]. Os complexos 9,10,11,12 e 15,20,21,22 contém ligantes capazes de emitir fluorescência na forma livre.	31
Figura 11: Estruturas dos complexos estudados por Green [42]. (*Complexo 5 reportado por Files, et al, 2007 [83]; **Complexo 1 reportado por Yamamoto, et al, 2012 [9]).....	32
Figura 12: Estruturas estudados por Kim [36]. Onde 30 (com $\text{IC}_{50} 20,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (hipóxia) e $35,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (normóxia)); e 31 (com $\text{IC}_{50} 1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (hipóxia) e $1,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (normóxia)).....	33
Figura 13: Estrutura dos complexos de Co^{III} obtidos e estudados por Renfrew, et al., 2013.	34
Figura 14: Representação das estruturas estudadas por Bustamante [49].....	35
Figura 15: Representação dos complexos estudados por Garcia [35].....	36
Figura 16: Estruturas dos complexos estudados por Pires, et al, 2016, onde 39 : pró-fármaco biorredutível; 40 e 41 são modelos para a forma reduzida da pró-fármaco [27].....	37
Figura 17: Estrutura heterodimérica do complexo 42 [90].	38

Figura 18: Redução do MTT para formação do formazan.....	43
Figura 19: Esquema de síntese para o complexo 1b-Co^{II} , realizada em temperatura ambiente e protegido da luz.	44
Figura 20: Esquema de síntese do precursor de Co ^{III} , [Co(TPA)Cl ₂]ClO ₄ , realizada em atmosfera de Argônio.	45
Figura 21: Esquema de síntese do complexo 2b-Co^{III}	46
Figura 22: Esquema de síntese para o complexo 2c-Co^{III} , realizada em temperatura ambiente e protegido da luz.	47
Figura 23: Esquema de síntese para o complexo 1b-Co^{II}	49
Figura 24: Esquema representando as possíveis etapas na formação do complexo 1b-Co^{II} , onde (a) é a formação do [Co(TPA)(S) ₂] ²⁺ e (b) a substituição das moléculas de solvente pelo ligante desprotonado.....	50
Figura 25: Unidade molecular do complexo 1b-Co^{II}	51
Figura 26: Unidade molecular do ligante HL	51
Figura 27: Empacotamento cristalino de HL , mostrando as interações intermoleculares $\pi-\pi$ <i>stacking</i> entre os anéis cumarínicos do dímero molecular. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para clareza da imagem.	54
Figura 28: Espectro de infravermelho do complexo 1b-Co^{II} exibido na faixa de 3700-400 cm ⁻¹ e do ligante HL inserido na faixa de 1900-400 cm ⁻¹ com destaque para as principais bandas.	56
Figura 29: Sobreposição dos espectros de UV-Vis de 1b-Co^{II} e HL a 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , em (a) DMF e (b) tampão fosfato, pH 7,4.	58
Figura 30: Sobreposição do espectro UV-Vis obtido em tampão fosfato e espectro teórico obtido por TD-DFT em água, para (a) HL e (b) 1b-Co^{II}	61
Figura 31: Síntese do precursor de Co ^{III} , [Co(TPA)Cl ₂]ClO ₄ , realizada em atmosfera de argônio.....	62
Figura 32: Esquema da segunda etapa de síntese do complexo 2b-Co^{III}	62
Figura 33: Espectro de RMN de ¹ H obtido em DMSO-d ₆ para o complexo 2b-Co^{III} (amostra do sólido 2) exibido na faixa de 0 a 9,5 ppm. Os deslocamentos químicos indicados em preto são referentes a 2b-Co^{III} , em vermelho a HL , em verde ao subproduto [Co(TPA)(OH ₂) ₂](ClO ₄) ₃ e em azul ao solvente DMF.	64

Figura 34: Espectro no infravermelho do complexo 2b-Co^{III} exibido na faixa de 3800-400 cm ⁻¹ e do ligante HL exibido da faixa de 1900-400 cm ⁻¹ com destaque para as principais bandas.	67
Figura 35: Esquema de síntese para o complexo 2c-Co^{III}	69
Figura 36: Espectros de RMN de ¹ H do ligante HL (a) e do complexo 2c-Co^{III} (b) em DMSO-d ₆ , de 9 a 0 ppm. As indicações a-d, a'-d' para CH ₂ do Py ₂ en indicam orientações diferentes para esses hidrogênios.	70
Figura 37: Espectro bidimensional (¹ H X ¹ H - COSY) do complexo 2c-Co^{III} em DMSO-d ₆ , de 2,0 a 8,5 ppm, contendo a representação simplificada da estrutura de 2c-Co^{III}	72
Figura 38: Espectro no infravermelho do complexo 2c-Co^{III} exibido na faixa de 3700-400 cm ⁻¹ e do ligante HL exibido da faixa de 1900-400 cm ⁻¹ com destaque para as principais bandas.	73
Figura 39: Sobreposição dos espectros no ultravioleta-visível de 2c-Co^{III} e HL a 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , em: (a) DMF e (b) tampão fosfato, pH 7,4.....	75
Figura 40: Representação da estrutura geométrica considerada para otimização da geometria de 2c-Co^{III}	76
Figura 41: Sobreposição do espectro experimental no UV-Vis obtidos em tampão fosfato e espectro teórico obtido por TD-DFT em água, para o complexo 2c-Co^{III}	78
Figura 42: Voltamograma cíclico do ligante livre HL , medido em DMF seco a 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em PTBA 0,1 mol L ⁻¹ , a 0,100 V s ⁻¹ , usando eletrodo de carbono vítreo (ET); Ag/AgCl (ER); Fio de Pt (EA) e ferroceno como referência interna, exibido na faixa de -2,25 a 0,75 V.	79
Figura 43: Voltamograma cíclico dos complexos 1b-Co^{II} , 2b-Co^{III} e 2c-Co^{III} , medido em DMF seco a 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em PTBA 0,1 mol L ⁻¹ , a 0,100 V s ⁻¹ , usando eletrodo de carbono vítreo (ET); Ag/AgCl (ER); Fio de Pt (EA) e ferroceno como referência interna, exibido na faixa de -2,25 a 0,75 V.....	82
Figura 44: Emissão de fluorescência do ligante HL e do complexo 2c-Co^{III} em tampão fosfato, pH 7,4, a 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , medidos a 37 °C, com λ _{exc.} = 450 nm.....	87
Figura 45: Sobreposição entre espectro de emissão de HL e monitoramento do complexo 2c-Co^{III} (1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) frente ao ascorbato de sódio (1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1% de metanol, a 37 °C, com λ _{exc.} = 450 nm, onde (a): 2c-Co^{III} sob atmosfera normal; e (b): 2c-Co^{III} sob atmosfera de argônio. Exibidos de 460 a 700 nm.....	88

Figura 46: Sobreposição entre espectro de emissão de HL e monitoramento do complexo 2c-Co^{III} ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1% de metanol, a 37 °C, com $\lambda_{\text{ex.}} = 450 \text{ nm}$ Exibidos de 460 a 700 nm.	89
Figura 47: Comparação do % de retorno da fluorescência para o complexo 2c-Co^{III} em solução tampão, pH 7,4, a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de ascorbato de sódio ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sob atmosfera de argônio e atmosfera normal, e na ausência do agente redutor.	90
Figura 48: Esquema genérico representando a reação de dissociação do ligante em meio redutor.....	90
Figura 49: Espectro de massas do complexo 2c-Co^{III} em MeOH contendo 2% de DMSO: (a) ausência e (b) presença de ascorbato de sódio.	91
Figura 50: Espectro de infravermelho do ligante HL exibido na faixa de $3700\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ com destaque para as principais bandas.	113
Figura 51: Voltamograma cíclico dos complexos (a) 1b-Co^{II} , (b) 2b-Co^{III} e (c) 2c-Co^{III} , medidos em DMF seco a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em velocidades de 50 a 200 mV s^{-1} , usando eletrodo de carbono vítreo (ET); Ag/Ag ⁺ (ER); Fio de Pt (EA) e ferroceno como referência interna.	113
Figura 52: Dependência linear da corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) versus $v^{1/2}$ dos complexos (a) 1b-Co^{II} , (b) 2b-Co^{III} e (c) 2c-Co^{III}	114
Figura 53: Comparação do retorno da fluorescência para o complexo 2c-Co^{III} monitorados por 8,5 h em solução tampão, pH 7,4, a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de ascorbato de sódio ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sob atmosfera de argônio e atmosfera normal, e na ausência do agente redutor.	114
Figura 54: Espectros de RMN de ^{13}C do complexo 2c-Co^{III} em DMSO- d_6 , de 180 a 8 ppm.	115
Figura 55: Espectro bidimensional de RMN de correlação de ^{13}C e ^1H do complexo 2c-Co^{III} em DMSO- d_6 , exibido na faixa de: (a) 1 a 9 ppm e 0,5 a 155 ppm, (b) ampliação da faixa de 2,5 a 5,5 ppm e 45 a 75 ppm.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais comprimentos (Å) e ângulo (°) de ligação do complexo 1b-Co^{II} e do ligante HL obtidos por DRX.....	55
Tabela 2: Atribuições das principais bandas do espectro de infravermelho obtido para HL e 1b-Co^{II} e dos cálculos TD-DFT.....	57
Tabela 3: Energias de excitações verticais de resposta linear selecionada, forças do oscilador calculadas por nível dpq-dOx em PBE0/def2-SVP//PBE0/def2-TZVP/COSMO e valores experimentais de λ e ϵ em tampão fosfato (pH 7,4) e DMF para o complexo 1b-Co^{II} e o ligante HL	60
Tabela 4: Atribuições das principais bandas do espectro de infravermelho experimental e calculado por TD-DFT do ligante HL e complexo 2b-Co^{III}	68
Tabela 5: Atribuições das principais bandas do espectro de infravermelho experimental e calculado por TD-DFT do ligante HL e complexo 2c-Co^{III}	74
Tabela 6: Energias de excitações verticais de resposta linear selecionada, forças do oscilador calculadas por nível dpq-dOx em PBE0/def2-SVP//PBE0/def2-TZVP/COSMO para o ligante HL e o complexo 2c-Co^{III}	77
Tabela 7: Dados eletroquímicos do ligante HL e dos complexos 1b-Co^{II} , 2b-Co^{III} e 2c-Co^{III} em DMF seco, a 0,100 V s ⁻¹ . Os valores de potenciais estão expressos em V vs Fc/Fc ⁺ e EPH.	86
Tabela 8: IC ₅₀ – Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos complexos 1b-Co^{II} e 2c-Co^{III} e do ligante HL . ($\mu\text{M} \pm \text{SD}^a$).....	92
Tabela 9: Dados das estruturas cristalográficas, da coleta e do refinamento do complexo 1b-Co^{II} e ligante HL	111
Tabela 10: Comprimentos e ângulos de ligação selecionados para a estrutura cristalográfica de HL	112

LISTA DE ABREVIATURAS

MeOH – metanol

DMSO – dimetilsulfóxido

EtOH – etanol

MeCN – acetonitrila

DMF – dimetilformamida

Et₃N – trietilamina

TPA – Tris(2-piridilmetil)amina

Py₂en – bis(2-piridilmetil)-1,2-diamino

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

IV – Infravermelho

UV-Vis – ultravioleta-visível

VC – voltametria cíclica

EPH – eletrodo padrão de hidrogênio

ET – eletrodo de trabalho

EA – eletrodo auxiliar

ER – eletrodo de referência

PTBA – perclorato de tetrabutilamônio

CCD – Cromatografia de camada delgada

FBS – soro fetal bovino

δ – deslocamento químico

ν – estiramento

MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

FBS – Soro fetal bovino

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

Hepes – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]etanossulfônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. As características da hipóxia e a proposta dos pró-fármacos biorredutíveis.....	20
2.3. Cumarinas: um breve resumo	24
2.4. Complexos de Co ^{III} como modelos de pró-fármacos biorredutíveis	28
3. PARTE EXPERIMENTAL	39
3.1. Materiais e métodos	39
3.2. Espectroscopia.....	39
3.3. Difração de raios X	40
3.4. Cálculos computacionais	41
3.5. Voltametria cíclica	41
3.6. Reatividade do complexo 2c-Co ^{III} frente ao ascorbato de sódio.....	42
3.7. Ensaio de citotoxicidade	42
3.8. Síntese dos complexos.....	44
3.8.1. Complexo [Co ^{II} (L)(TPA)]ClO ₄ , 1b-Co ^{II}	44
3.8.2. Complexo [Co ^{III} (L)(TPA)](ClO ₄) ₂ , 2b-Co ^{III}	45
3.8.3. Complexo [Co ^{III} (L)(Py ₂ en)(ClO ₄) ₂ .2H ₂ O, 2c-Co ^{III}	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Síntese e caracterização dos complexos	49
4.1.1. Complexo 1b-Co ^{II}	49
4.1.1.1. Determinação estrutural por difração de raios X	50
4.1.1.2. Espectroscopia na região do infravermelho	55
4.1.1.3. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível	58
4.1.2. Complexo 2b-Co ^{III}	61
4.1.2.1. Espectroscopia de RMN de ¹ H	63
4.1.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho	66

4.1.3. Complexo 2c-Co^{III}	69
4.1.3.1. Espectroscopia de RMN de ¹H	70
4.1.3.2. Espectroscopia na região do infravermelho	73
4.1.3.3. Espectroscopia no ultravioleta-visível	75
4.2. Estudos de voltametria cíclica	79
4.3. Estudo de estabilidade e reatividade do complexo 2c-Co^{III}	87
4.4. Ensaio de citotoxicidade	91
5. CONCLUSÕES	94
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
7. ANEXOS	111
7.1. Difração de raios X	111
7.2. Infravermelho	113
7.3. Voltametria cíclica	113
7.4. Estudos de estabilidade e reatividade de 2c-Co^{III}	114
7.5. Espectroscopia de RMN de ¹³C	115

1. INTRODUÇÃO

Complexos de cobalto vêm sendo estudados em química inorgânica medicinal como promissores agentes bioativos. As diversas formas estruturais que o Co^{II} e o Co^{III} podem assumir, além das suas propriedades eletrônicas e magnéticas, permitem uma variada exploração na elaboração de novos fármacos, que, em muitos casos, podem tornar-se mais ativos e/ou mais seletivos do que as moléculas orgânicas livres [1,2]. As atividades biológicas reportadas para complexos de cobalto envolvem diferentes formas de ação, como a inibição de enzimas, interação com DNA, atividade fotodinâmica, carreamento de fármacos, entre outras.

Muitos grupos de pesquisa têm investigado complexos de Co^{III} como uma classe promissora de agentes anticâncer específicos para regiões em hipóxia de tumores. Esses complexos atuam como carreadores de moléculas com propriedades farmacológicas e vêm sendo classificados como pró-fármacos biorredutíveis [3]. Tal classificação se deve às propriedades redox do cobalto, que apresenta variação na cinética de substituição de acordo com seu estado de oxidação. As espécies de Co^{III} (inertes) podem sofrer redução em um ambiente de hipóxia, formando espécies de Co^{II} (lábeis) [4]. A labilidade do estado de oxidação +2 do cobalto leva à liberação do ligante citotóxico nas células tumorais em hipóxia, conduzindo à morte ou inibindo o crescimento celular.

Moléculas orgânicas que já apresentam atividade anticâncer ou fazem parte de uma classe com possível atividade citotóxica vêm sendo estudadas na forma coordenada ao Co^{III} com intuito de torná-las mais seletivas e/ou melhorar suas atividades. Dentre esses compostos estão os agentes alquilantes, como as mostardas nitrogenadas, os inibidores de metaloproteinases de matriz como o marismastat, derivados de 8-hidroxiquinolina, acetilacetatos, cumarinas, entre outros [3]. Muitos desses derivados apresentam mecanismo de ação já conhecido e a coordenação ao metal é estudada para gerar seletividade nas células em hipóxia.

As cumarinas são uma classe de compostos orgânicos de origem natural ou sintética, cuja estrutura mais simples corresponde à 1,2-benzopirona e seus derivados variam de acordo com grupos substituintes presentes nesta porção. Duas das propriedades mais exploradas nas cumarinas são a capacidade de emissão de fluorescência de derivados 7-substituídos [5,6] e a vasta atividade farmacológica exibida pelos seus derivados, como, por exemplo, antifúngica, antioxidante e anticâncer [7]. Esta última apresenta diversos mecanismos investigados,

incluindo a ação como agente antimitótico, inibição de quinases, da angiogênese, da enzima telomerase, da proteína HSP90 e da anidrase carbônica, entre outros [8].

Derivados cumarínicos vêm sendo reportados na forma coordenada ao íon Co^{III} como propostas de pró-fármacos biorredutíveis [9,10]. Por exemplo, a coordenação com o cobalto (+2 ou +3) levou a modificações na atividade biológica e a supressão da fluorescência de cumarinas 7-substituídas, o que permite o estudo da liberação deste ligante por técnicas de fluorescência [9,11].

Baseando-se nos aspectos citados, este trabalho tem como objetivo principal a obtenção de dois novos complexos de Co^{III} contendo um ligante híbrido de cumarina fluorescente com um substituinte 3- β -cetoéster [12] e uma amina tetradentada auxiliar (TPA ou Py_2en) (Figura 1), que possam atuar como pró-fármacos biorredutíveis.

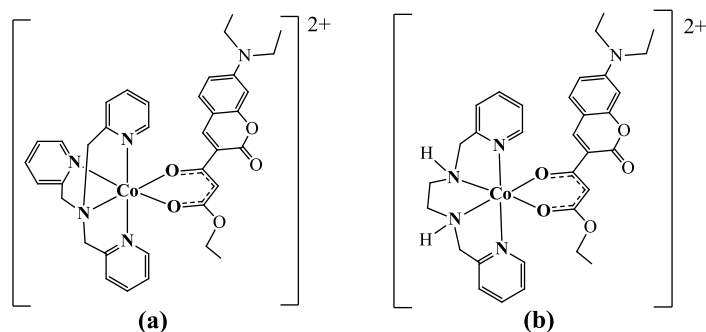


Figura 1: Representação geral dos complexos de cobalto que se deseja obter neste trabalho, onde: **(a)** refere-se ao complexo de Co^{III} contendo o TPA, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})(\text{TPA})]^{2+}$ e **(b)** ao complexo de Co^{III} contendo o Py_2en , $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})(\text{Py}_2\text{en})]^{2+}$.

Dentre os objetivos específicos, estão: i) realização de cálculos DFT de otimização de estrutura, cálculos de HOMO e LUMO e das transições eletrônicas dos compostos; ii) estudos de voltametria cíclica para investigação dos principais processos redox, em especial, investigação do processo $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ para os complexos; iii) investigação da estabilidade dos complexos em solução; iv) reatividade frente ao ascorbato de sódio como agente redutor, em meio oxigenado e na presença de argônio e v) teste de citotoxicidade dos compostos contra linhagens de células tumorais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde a descoberta das propriedades citotóxicas da cisplatina nos anos de 1960, a química inorgânica tem crescido muito nas pesquisas em química medicinal. A busca por tratamentos alternativos do câncer e/ou pela descoberta de novos fármacos mais seletivos e menos tóxicos ao organismo abrange tanto a obtenção de complexos metálicos análogos à cisplatina quanto de outros metais de transição como Rutênio, Ouro, Zinco, Cobre e Cobalto [1,13,14]. Após aprovação da cisplatina pela FDA¹ (*Food and Drug Administration*) em 1978, outros dois fármacos também de Pt^{II} foram registrados: a Carboplatina, em 1989, e a Oxaliplatina, em 2002 [15], os quais apresentam vantagens e desvantagens em relação à cisplatina e também são registrados pela ANVISA² [16].

A variedade estrutural dos compostos de coordenação pode melhorar a atividade anticâncer de moléculas orgânicas com capacidade de atuar como ligantes [1]. As curcuminas, por exemplo, apesar de serem moléculas ativas contra várias doenças, incluindo o câncer, sua baixa solubilidade em água e baixa estabilidade no soro sanguíneo são barreiras que dificultam o uso dessa molécula livre, sendo avaliadas na forma combinada com metais [17-19]. Estudos mostram que a conjugação da curcumina com moléculas quelantes ou a coordenação direta da curcumina a metais como Ni^{II}, Cu^{II}, Zn^{II} e Pd^{II} podem melhorar a atividade dessa molécula, promover maiores interações com DNA e outras proteínas [20-22], motivar a aplicação na terapia fotodinâmica [20], entre outros [23].

Complexos de Rutênio também despertam grande interesse para as pesquisas de drogas anticâncer. A forma octaédrica do Ru^{II} e Ru^{III} dão a vantagem de dois ligantes a mais em sua esfera de coordenação para serem explorados, quando comparado com a Pt^{II} (que assume geometria quadrática plana). Até 2015, dois complexos de Ru^{III} contendo ligante Cl⁻ e imidazóis, KP1019 e NAMI-A, alcançaram a fase de avaliações clínicas contra câncer primário e tumores secundários, respectivamente [13]. O Ru^{III} também tem sido avaliado como modelo de pró-fármaco ativado por redução em regiões específicas de tumores sólidos, assim como a Pt^{IV} e o Co^{III} [24,25]. Esses modelos são explorados com objetivo de superar a

¹ *Food and Drugs Administration*.é um órgão governamental dos EUA responsável pelo controle de fármacos e alimentos.

² Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Órgão responsável por controlar e regular a área sanitária de serviços e produtos, incluindo os fármacos.

resistência de algumas células tumorais e melhorar a seletividade de moléculas orgânicas que já apresentam atividade.

Os pró-fármacos são, basicamente, agentes inativos que podem ser ativados através de um estímulo externo como luz, radiação ionizante ou ambiente redutor [26,3]. Muitos complexos de Co^{III} vêm sendo investigados como potenciais agentes ativados por bio-redução, exibindo seletividade às células de câncer que apresentam-se em ambiente hipóxico. Esses agentes são capazes de liberar uma molécula citotóxica (ligante) após a redução do Co^{III} a Co^{II} , atuando diretamente no alvo pretendido [3,27,28]. Essa seletividade é observada porque a região de hipóxia em um tumor é caracterizada, principalmente, pela sua capacidade redutora, facilitando a ativação do pró-fármaco. Estudos têm sido direcionados para o tratamento específico da hipóxia tumoral, pois diversos fatores levam à resistência dessas células para os tratamentos tradicionais de quimioterapia e radioterapia [29].

2.1. As características da hipóxia e a proposta dos pró-fármacos biorredutíveis

A hipóxia surge primeiramente devido às limitações de difusão de oxigênio na célula, que, por sua vez, é causada pela pouca vascularização sanguínea. O crescimento e a divisão acelerados, característicos de células cancerosas, levam à formação de grandes tumores sólidos que apresentam uma rede de vascularização deficiente, onde as distâncias intercapilares podem ser além da faixa de difusão do O_2 (até 200 μm dependendo da concentração de oxigênio local) [30]. Isto ocorre porque, apesar da angiogênese³ acompanhar o crescimento do tumor, ela ocorre em velocidades menores do que a divisão celular [31]. Sendo assim, um tumor pode apresentar regiões mais oxigenadas, onde a vascularização é suficiente (normóxia), regiões mais distantes dos vasos sanguíneos, onde a pressão de oxigênio é baixa (hipóxia) e uma região mais interna necrótica (anóxia), como ilustrado na Figura 2 [31].

³ Formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes.

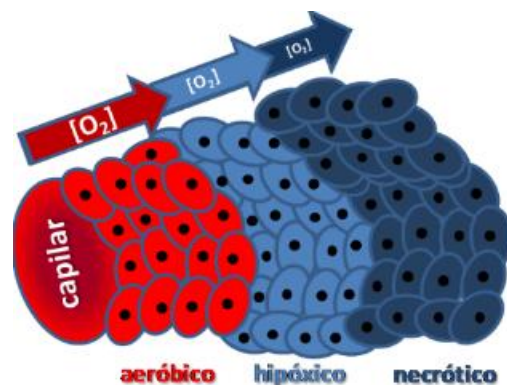


Figura 2: Representação de um tumor sólido com região de hipóxia (entre 5 e 10 mmHg de O_2) e necrose. (Figura: BUSTAMANTE, et al., 2009 [31]).

Um dos principais problemas apresentados pela hipóxia de tumores malignos é a sua resistência aos tratamentos convencionais de câncer (quimioterapia e radioterapia), tornando necessária a busca por tratamentos alternativos e fármacos mais eficientes e seletivos a essas condições [29]. O conhecimento sobre as características e comportamento das células em hipóxia é crucial para a exploração de tratamentos alternativos para os tumores sólidos. Por exemplo, a baixa concentração de oxigênio nessas células faz com que os níveis de ATP sejam diminuídos, a concentração de glicose aumentada, conduzindo à fermentação láctica e aumentando os níveis de ácido pirúvico e ácido láctico no meio. Consequentemente, o pH no citoplasma das células em hipóxia é mais baixo [30,32]. Além disso, os baixos níveis de oxigênio levam a ambientes mais redutores que das células normalmente vascularizadas [30]. Esta última característica despertou o interesse pelo desenvolvimento de pró-fármacos que sejam ativados após uma biorredução, sendo desta forma, mais seletivos a ambientes em hipóxia.

Basicamente, os pró-fármacos biorredutíveis compreendem uma classe de moléculas capazes de apresentar atividade citotóxica após sofrerem redução em meio biológico. Compostos orgânicos pertencentes às classes das quinonas, dos nitrocompostos, N-óxido aromáticos e N-óxido alifáticos já foram investigados como potenciais espécies ativadas por biorredução, e muitos apresentaram bons resultados em fases clínicas e seletividade à hipóxia [33]. Os compostos de coordenação também se enquadram na busca por esse tipo de agente, onde a ativação ocorre após a redução do centro metálico. Complexos de Ru^{III} , Pt^{IV} e Co^{III} apresentam mecanismos redox que podem levar à formação de uma espécie ativa, compreendendo em uma classe com seletividade favorável à hipóxia [24,25]. Para os

complexos de Co^{III} , a proposta de pró-fármaco envolve o carreamento de uma molécula bioativa (ligante) que será liberada após a redução do Co^{III} para Co^{II} .

Para a elaboração de uma nova estrutura molecular cujo objetivo seja atuar como pró-fármaco biorredutível é necessário seguir alguns parâmetros principais: (a) a solubilidade e a difusibilidade adequadas; (b) a redução da espécie somente nas regiões celulares em hipóxia; (c) a citotoxicidade apenas das espécies reduzidas. A faixa de potencial de redução ideal sugerida para o ambiente de hipóxia é de -400 a -200 mV vs EPH [9,34], embora alguns trabalhos considerem uma faixa um pouco maior de -500 a -100 mV vs EPH, para que o pró-fármaco seja ativado por flavoproteínas [25,35,36]. Desta forma, a eficiência de um pró-fármaco biorredutível é dependente, também, do seu potencial redox, de modo que geralmente são feitas correlações entre a atividade e o comportamento eletroquímico [31,37]. Obviamente outros parâmetros importantes devem ser avaliados sobre os ensaios traçados de citotoxicidade do composto, como estereoquímica, difusão celular, solubilidade no plasma sanguíneo, estabilidade em ambiente fisiológico, metabolismo, permeabilidade das membranas celulares, interações enzimáticas, entre outros [37].

2.2. Características do cobalto para uso como pró-fármacos biorredutíveis

Complexos de cobalto apresentam-se como uma classe promissora de agentes bioativos que vêm sendo explorados como espécies capazes de se ligarem à proteínas contendo resíduos de histidina [38], gerar espécies reativas de oxigênio por fotoindução [39-41], carrear e liberar moléculas ativas para o meio intracelular [3,42], entre outras aplicações que podem ser investigadas para fins medicinais [1,3]. As múltiplas formas geométricas que os compostos de coordenação de Co^{II} e Co^{III} podem assumir, além das características magnéticas e eletrônicas, contribuem para a elaboração de novas estruturas tridimensionais como modelos de fármacos contendo estes íons [1].

Complexos de Co^{III} têm despertado o interesse para estudos de pró-fármacos biorredutíveis devido a propriedade redox do metal [3,27,28]. O estado de oxidação +3 assume uma configuração eletrônica $3d^6$, baixo spin, o que em geral leva a uma alta energia de estabilização do campo ligante, proporcionando a formação de complexos cineticamente mais inertes. Já no estado +2 ($3d^7$, alto spin), os complexos são mais lábeis, realizando reações de substituições mais facilmente [4,43]. Essa característica do metal permite que após

a ocorrência do processo $\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}}$, o ligante – que possui propriedades citotóxicas – seja liberado no meio celular, promovendo a atividade [27,44], como representado na Figura 3.

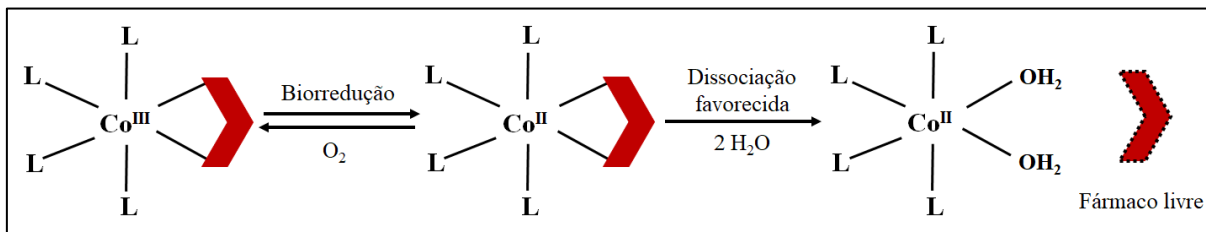


Figura 3: Esquema genérico representativo da dissociação de um ligante citotóxico após a redução do Co^{III} para Co^{II} em um complexo, considerando-se a substituição por moléculas de água, e ilustrando o equilíbrio de reoxidação do metal sendo favorecido pela presença de oxigênio.

A proposta, de modo geral, é obter complexos de Co^{III} que sejam suficientemente estáveis nas condições fisiológicas, mas que em um ambiente mais redutor, como a hipóxia, o metal sofra redução de 1 elétron e libere o ligante. Pode-se imaginar que esse processo é dado por enzimas e proteínas capazes de reduzir uma molécula (redutases) [45], e que elas estão presentes em qualquer célula do organismo, podendo levar a redução do cobalto também fora do alvo [31]. Entretanto, a maior concentração de O_2 em células em condições normóxia é crucial para que o Co^{II} formado seja reoxidado antes da liberação do ligante, retomando a forma inativa, como ilustrado na Figura 3. Já nas células em hipóxia, a baixa concentração de O_2 desfavorece o equilíbrio de reoxidação do Co^{II} a Co^{III} , facilitando a liberação do ligante a partir da espécie lábil formada [3].

Diferentes classes de compostos orgânicos são usadas como agentes quelantes em complexos de Co^{III} para obtenção de modelos de pró-fármacos biorredutíveis. Esses compostos podem ser moléculas que já apresentam mecanismo de ação contra células de câncer, como o inibidor de Metaloproteinase de Matriz, Marimastat [42] e as mostardas nitrogenadas [46], ou então são moléculas com potenciais citotóxicos já descritos, como as curcuminas [47], hidroxiquinolininas [48], bases de Schiff [35], naftoquinonas [49], cumarinas [10], entre outros.

2.3. Cumarinas: um breve resumo

As cumarinas são estruturas simples, compreendendo um grupo de compostos de origem natural encontradas em espécies vegetais. Sua estrutura básica consiste de uma benzo- α -pirona – lactonas provenientes do ácido *o*-hidroxi-cinâmico (Figura 4).

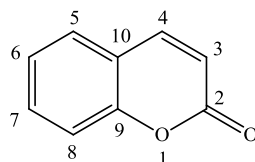


Figura 4: Estrutura simples de uma cumarina (1-benzopiran-2-ona).

Um dos principais interesses nas cumarinas reside em suas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória e antioxidante [50,51], anti-HIV [52,53], antimicrobiana [54,55], antiviral [56], anticoagulante, anti-Alzheimer [57,58] e anticâncer [59]. Para a atividade anticâncer, alguns mecanismos já são investigados e mostram que os derivados de cumarina atuam como agente antimetabólico⁴, na inibição de quinases⁵, angiogênese, da enzima telomerase⁶, da proteína HSP90⁷ e da anidrase carbônica [60]. A grande variedade de estruturas modificadas biogeneticamente das cumarinas faz com que essa classe seja uma das mais estudadas pela química de produtos naturais [61]. Além disso, a inserção de diferentes grupos em quaisquer das posições possíveis do núcleo cumarínico pode ser realizada de forma sintética, enriquecendo cada vez mais a variedade estrutural e aplicações biológicas, conseqüentemente. Modificações químicas na estrutura base da cumarina alteram propriedades físico-químicas, biológicas e farmacológicas, podendo levar ao aumento da atividade do composto e/ou a diminuição da toxicidade [62].

⁴ Agentes que impedem a divisão celular (impede a mitose).

⁵ Enzimas que modificam outras proteínas adicionando quimicamente grupos fosfato (fosforilação).

⁶ Enzima responsável pela duplicação de telômeros, os quais mantêm a integridade cromossômica e sobrevivência das células

⁷ Dentre suas várias funções, a HSP90 é uma proteína que também atua na estabilização de outras proteínas necessárias para o crescimento tumoral, sendo alvo de estudos para medicamentos anticâncer.

A Figura 5 exibe algumas estruturas de derivados cumarínicos que já foram clinicamente usados. Por exemplo, a Warfarina e a Fenprocumona são fármacos já registrados tanto pela ANVISA quanto pela FDA e são usados como agentes anticoagulantes principalmente no tratamento e prevenção de doenças tromboembólicas [63-65].

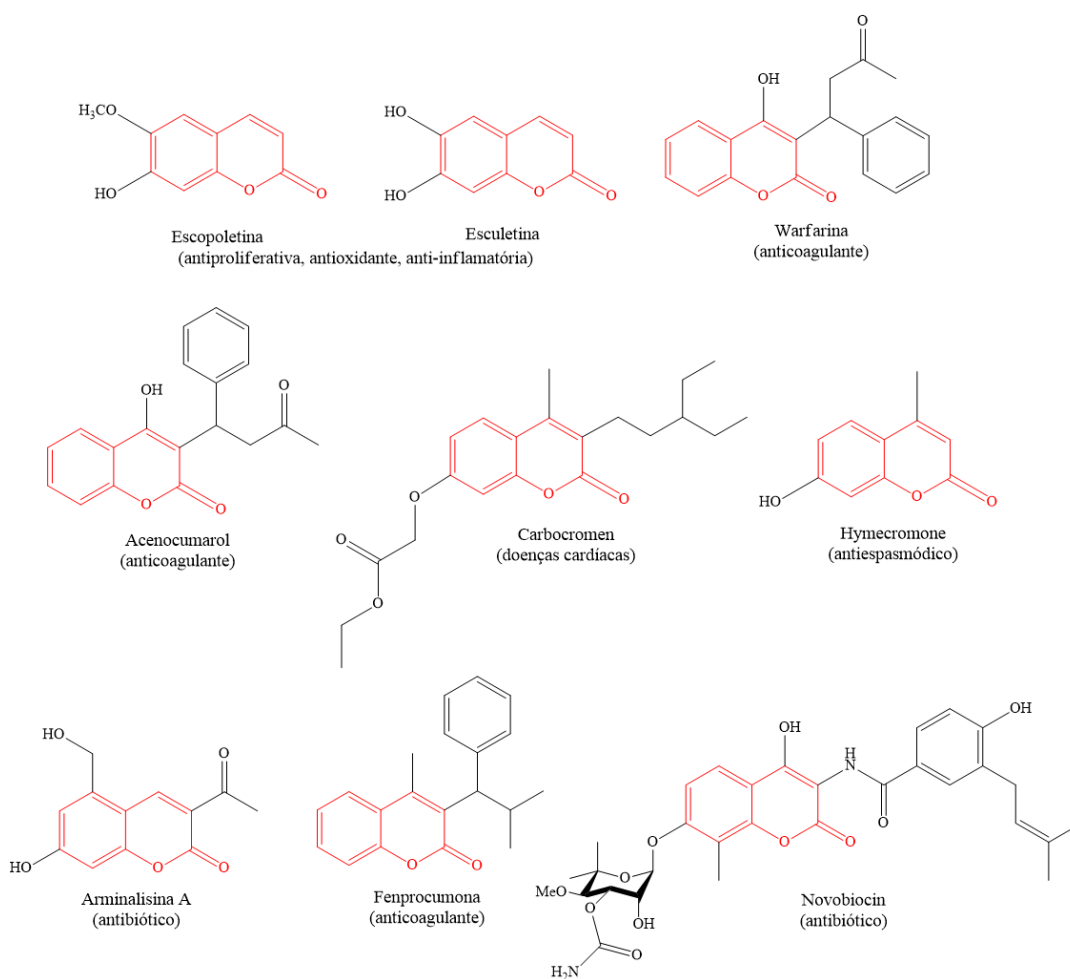


Figura 5: Derivados de cumarina usados clinicamente [66]. O núcleo cumarínico está destacado em vermelho.

O novobiocin (Figura 5), também registrado pela FDA [63], é um 4,7-diidroxicumarina-7-O-glicosídeo com um nitrogênio ligado na posição C-3. Essa molécula apresenta atividade antibiótica por ser um potente inibidor da DNA girase bacteriana e é isolada a partir da bactéria *Streptomyces niveus* [66]. Além disso, o novobiocin foi identificado como o primeiro inibidor C-terminal Hsp90 junto com a clorobiocina e a coumermicina – outros derivados cumarínicos [67-69]. Apesar de sua interação com a proteína Hsp90, a baixa eficácia contra

células de câncer (IC₅₀ ~ 70 μM) do novobiocin levou a inadequação dos estudos dessa cumarina como inibidor da proteína [70].

Contudo, modificações realizadas para obtenção de moléculas análogas ao novobiocin levaram ao aumento significativo de sua citotoxicidade contra algumas linhagens de células de câncer (SKBr3, MCF-7, PC3-MM2, LNCaP)⁸ [70]. No trabalho realizado por Kusuma e colaboradores, mais de 50 análogos foram obtidos a partir da substituição do núcleo de cumarina por naftaleno, quinolinonas ou quinolonas, além de modificações feitas no grupo glicosídeo do novobiocin (Figura 6).

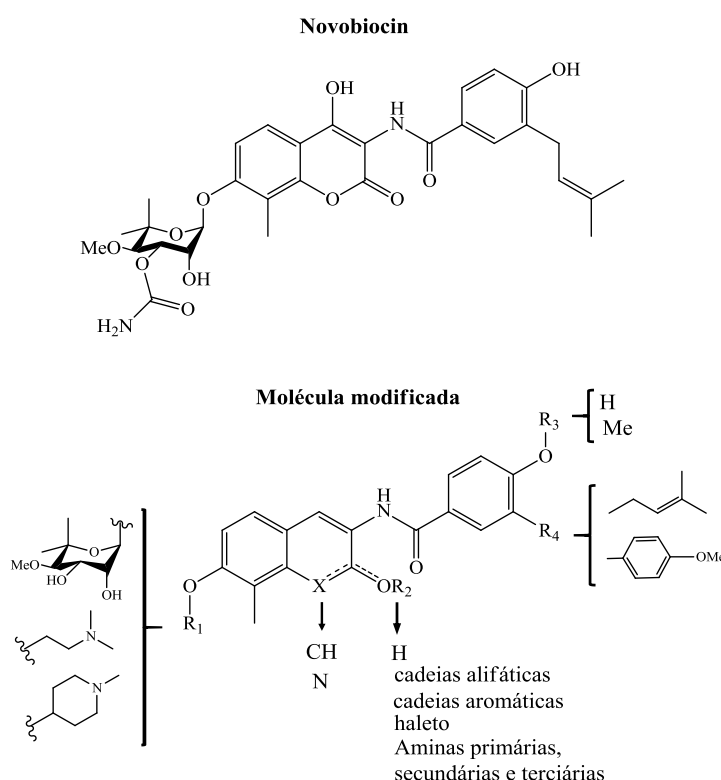


Figura 6: Molécula de Novobiocin e suas modificações estruturais [70].

Apesar de alguns derivados não exibirem valor de IC₅₀ devido a fatores físico-químicos, como solubilidade, grande parte dos compostos mostraram atividade maior que o novobiocin contra as linhagens testadas, onde os valores de IC₅₀ foram abaixo de 15 μM para a maioria dos casos [70].

Híbridos de cumarinas contendo grupos que apresentem ação farmacológica têm sido reportadas como potenciais agentes anticâncer [8,71,72]. Na estratégia de potencializar a

⁸ Linhagens celulares de SKBr3: adenocarcinoma mamário; MCF-7: câncer de mama; PC3-MM2 e LNCaP: câncer de próstata.

atividade farmacológica, derivados cumarínicos contendo um grupo quelante conjugado são reportados na literatura como ligantes em compostos de coordenação contendo íons de cobre, níquel, zinco e cobalto [73-75]. Em alguns casos, a ação do híbrido de cumarina pode ser diminuída quando testados na sua forma coordenada. Hameed e colaboradores, por exemplo, estudaram o potencial inibitório contra urease⁹ de conjugados cumarina-tiosemicarbazonas na forma livre e coordenada a íons de Cu^{II}, Ni^{II}, Zn^{II} e Co^{II}. Na série de 33 complexos, só foi possível determinar o IC₅₀ de apenas dois complexos (Cu^{II}, IC₅₀¹⁰ = 19,36 ± 0,26 µM; Co^{II} IC₅₀ = 116,12 ± 0,09 µM), contudo foram menos ativos que seus respectivos ligantes livres [76]. Em outro caso, complexos de Co^{III} com híbrido cumarina-hidroxiato exibiram atividade contra carcinoma de cólon similar à da cumarina livre (IC₅₀ na faixa de 40 a 58 µM), porém os complexos metálicos apresentaram melhor difusão celular [9].

Uma outra aplicação bastante explorada das cumarinas é a sua propriedade de emissão de fluorescência sob a luz UV (~365 nm), sendo utilizadas na indústria como sondas de laser fluorescente, corantes, e podendo ser facilmente identificadas em um extrato natural por cromatografia de camada delgada [61,77]. Essa característica emissiva ocorre para derivados contendo grupos doadores 7-substituídos, como a umbeliferona, por exemplo (Figura 7) [5,6]. Muitos derivados são capazes, inclusive, de emitir fluorescência na luz visível [61].

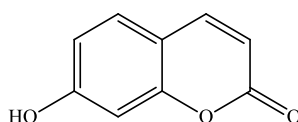


Figura 7: Estrutura da umbeliferona, 7-hidroxicumarina.

Assim como qualquer molécula emissiva, as cumarinas podem ter uma grande supressão da fluorescência por mecanismo dinâmico ou estático. Este último, consiste basicamente na formação de um complexo entre a molécula fluorescente e uma espécie supressora, como os íons de metais de transição Fe^{II}, Co^{II} e Co^{III}, por exemplo [78,79]. Essa supressão é decorrente de transferências de elétrons, de energia ou interações paramagnéticas entre a espécie emissiva e a supressora [1,80,81] e pode ser revertida a partir da dissociação

⁹ Enzima produzida pela bactéria *Helicobacter pylori* – que se aloja no estômago ou intestino – capaz de converter ureia em amônia e ácido carbônico.

¹⁰ Concentração de um composto necessária para inibir 50% da viabilidade celular *in vitro*.

do complexo [9,78]. Portanto, além da coordenação com metal proporcionar mudanças farmacológicas da cumarina, a interação com o cobalto (+2 ou +3) leva à extinção da fluorescência de cumarinas 7-substituídas [9,11]. Essa característica tem sido empregada em ensaios espectroscópicos de trabalhos envolvendo química de coordenação e bioinorgânica [10,82].

2.4. Complexos de Co^{III} como modelos de pró-fármacos biorredutíveis

Yamamoto e colaboradores [9] estudaram uma série de quatro complexos de Co^{III} contendo uma amina tripodal e um ligante cumarínico com grupo hidroxamato na posição C-3 (Figura 8).

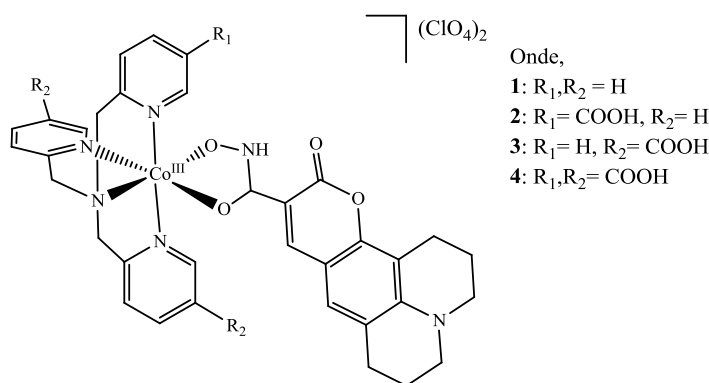


Figura 8: Representação das estruturas dos complexos de Co^{III} estudados por Yamamoto [9], onde $R_1, R_2 = \text{H}$ para **1**; $R_1 = \text{COOH}, R_2 = \text{H}$ para **2**; $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{COOH}$ para **3**; $R_1 = R_2 = \text{COOH}$ para **4**.

Os autores observaram que a fluorescência do derivado de cumarina foi suprimida em 98% após a coordenação, sendo possível estudar a liberação do ligante por espectroscopia de fluorescência. Apesar dos potenciais de redução do Co^{III} nos complexos terem apresentado valores muito abaixo da faixa considerada ideal para hipóxia (de $-0,95$ a $-1,29$ V vs EPH), eles exibiram características importantes para um modelo de pró-fármaco biorredutível. As espécies foram reativas em meio redutor, liberando o ligante em solução apenas com a adição de ácido ascórbico. Além disso, esta dissociação mostrou-se dependente da concentração de O_2 , onde o percentual do retorno da fluorescência foi maior em meio desoxigenado. Esse resultado indicou para os autores que a liberação da cumarina ocorre por mecanismo redox,

em que o ligante só é liberado após a redução do Co^{III} a Co^{II} . Os autores também avaliaram a citotoxicidade dos complexos e do derivado de cumarina livre contra linhagem DLD-1 (carcinoma de cólon), observando que a complexação não alterou significativamente os valores de IC_{50} (ligante livre = $55 \pm 1 \mu\text{M}$; complexos **1-4** na faixa de 40 a $58 \mu\text{M}$). Contudo, ensaios para avaliação da difusibilidade dos compostos mostrou que a captação dos complexos pelas células é dependente do pH, onde **1** e **2** apresentaram maior acumulação em meio mais básico, **3** e **4** em meio mais ácido e o ligante livre não exibiu dependência do pH. Esse comportamento atribui certa seletividade aos complexos para células com diferentes concentrações de H^+ . Além disso, estudos acompanhados por microscopia confocal de fluorescência em esferoides¹¹ com a mesma linhagem celular (DLD-1) mostraram que os complexos são capazes de difundir melhor para o centro do esferoide, enquanto que o ligante se acumula nas regiões periféricas, indicando uma difusibilidade menor que a dos complexos. A emissão de fluorescência dos esferoides tratados com os complexos indicou a liberação da cumarina no meio celular, sugerindo que os derivados de Co^{III} são bons carreadores do ligante e seletivos à hipóxia.

Esse mesmo sítio de coordenação (o hidroxamato) foi utilizado por Files e colaboradores cinco anos antes dos complexos descritos por Yamamoto, também como um modelo de pró-fármaco ativado por hipóxia [83]. O ligante usado por Files, denominado *Marimastat* (representado na Figura 9 na forma coordenada, composto **5**), apresenta-se como inibidor da metástase de células cancerosas através da interação com Metaloproteinases de Matriz (MMPs). O *Marimastat* é uma molécula com ligações peptídicas e contém um grupo funcional hidroxamato em uma das extremidades, o qual pode interagir com metais como ligante N,O doador. A capacidade do *Marimastat* em inibir as MMPs se dá justamente pela interação do hidroxamato com o zinco presente nessas enzimas [84,85]. Devido a essa característica bioquímica, carreadores do *Marimastat* são estudados com intuito de explorar a liberação desse inibidor em um alvo celular específico.

¹¹ São agregados tridimensionais de células tumorais que apresentam muitas das características dos tumores sólidos, incluindo gradientes de concentração de oxigênio.

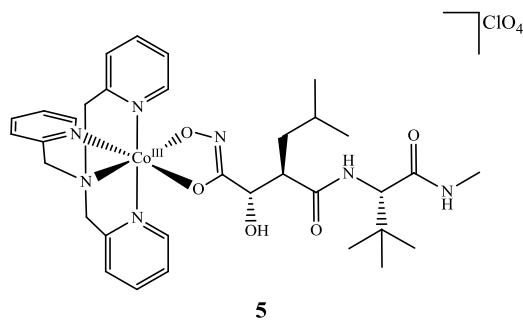
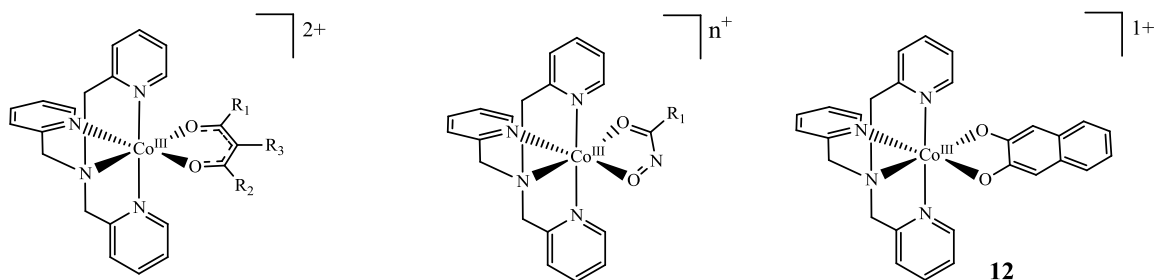


Figura 9: Complexo de Co^{III} contendo TPA e *Marimastat* (**5**) como ligante citotóxico reportado por Files [83].

O complexo **5** exibiu valores de IC_{50} baixos contra linhagem de melanoma mamário 4T-1 ($0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$), mas o ligante livre foi mais ativo, apresentando IC_{50} de $0,007 \pm 0,005 \mu\text{M}$. Essa diferença foi associada ao fato da porção farmacofórica do ligante estar comprometida com a coordenação ao Co^{III} . Já os ensaios *in vivo* mostraram que o complexo inibiu muito mais o crescimento do tumor quando comparado com o *Marimastat* livre. A partir desses resultados, os autores concluíram que o complexo pode atuar como um bom carreador do fármaco, liberando-o no tumor e agindo com mais eficiência.

Uma série de complexos de Co^{III} contendo ligantes também com grupo hidroxamato e outros grupos β -dicetonados e catecol, além de aminas tripodais TPA e TREN (Figura 10), foram sintetizados e estudados por Bonnitcha e colaboradores [44]. O objetivo principal do trabalho foi avaliar características como pK_a , lipofilicidade, potencial redox entre outros parâmetros que levam um composto a ser biologicamente efetivo.



6: $R_1, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{H}$.

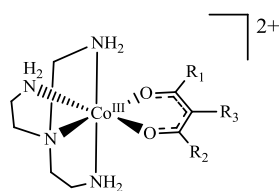
7: $R_1, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{Cl}$.

8: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{Ph}, R_3 = \text{H}$.

9: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{naftil}, R_3 = \text{H}$.

10: $R_1 = \text{naftil}; n = 1+$

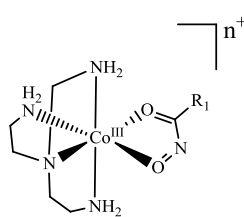
11: $R_1 = \text{naftil}; n = 2+$



13: $R_1, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{H}$.

14: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{ph}, R_3 = \text{H}$.

15: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{naftil}, R_3 = \text{H}$.



16: $R_1 = \text{CH}_3; n = 1+$.

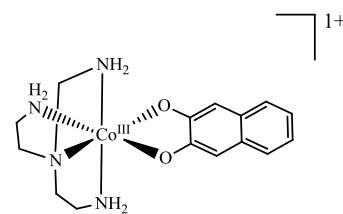
17: $R_1 = \text{CH}_3; n = 2+$.

18: $R_1 = \text{Ph}; n = 1+$.

19: $R_1 = \text{Ph}; n = 2+$.

20: $R_1 = \text{naftil}; n = 1+$

21: $R_1 = \text{naftil}; n = 2+$



22

Figura 10: Complexos reportados por Bonnitcha [44]. Os complexos **9,10,11,12** e **15,20,21,22** contém ligantes capazes de emitir fluorescência na forma livre.

Os complexos apresentaram potenciais de redução na faixa de $-0,52$ a $-1,72$ V vs Fc/Fc^+ , que variaram de acordo com a capacidade retiradora ou doadora de elétrons dos ligantes. A amina TPA – que contém grupos piridínicos – levou a potenciais menos negativos, que foram associados à sua capacidade de retirar elétrons do centro metálico por retrodoação. Os autores também monitoraram o comportamento do complexo em solução contendo agente redutor (ácido ascórbico) por espectroscopia de fluorescência. Contudo, só foi possível avaliar os compostos contendo ligantes com grupo naftil, que apresentam propriedades de emissão. Eles observaram que apenas o composto **9** mostrou dissociação do ligante em 24 h, atingindo até 40% da emissão do ligante livre. Essa resposta foi associada ao maior potencial de redução do Co^{III} nesse complexo, $-0,56$ V vs Fc/Fc^+). Apesar da citotoxicidade dos complexos de Bonnitcha serem inativos contra carcinoma de colo DLD-1 (>200 μM), a espécie **9** exibiu o melhor resultado, com IC_{50} de 66 ± 3 μM , o qual não foi estatisticamente diferente do

ligante livre ($60 \pm 1,6 \mu\text{M}$). Da mesma forma o complexo não exibiu seletividade para célula com hipóxia simulada, exibindo IC_{50} de $74 \pm 4 \mu\text{M}$.

Recentemente foi publicado um trabalho explorando a influência das aminas auxiliares sobre a liberação de derivados de ácido hidroxâmico em complexos de Co^{III} [42]. O trabalho foi realizado pelo mesmo grupo de pesquisa das estruturas descritas nesta sessão. Os autores reportaram as propriedades das séries dos complexos contendo TPA e TREN já descritas incluindo análogos com amina CYCLEN (estruturas ilustradas na Figura 11), com objetivo de avaliar os efeitos das aminas sobre propriedades físicas e biológicas dos complexos.

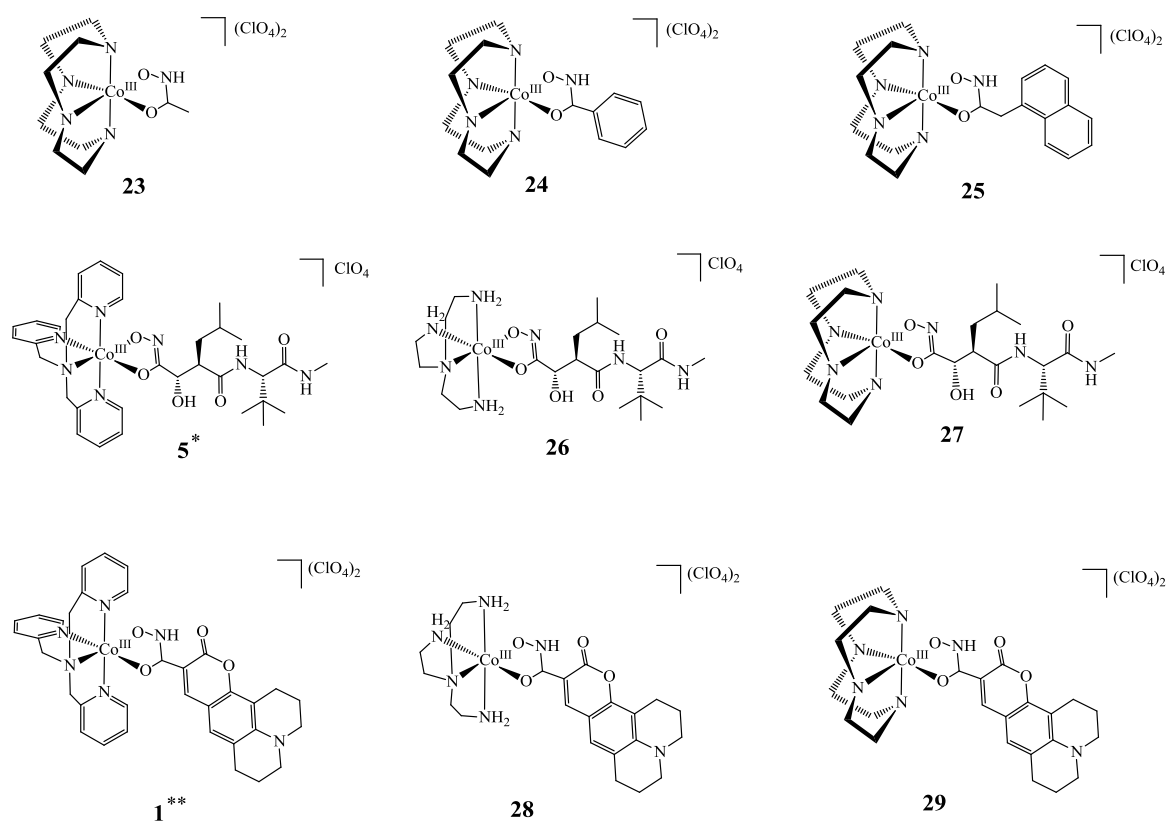


Figura 11: Estruturas dos complexos estudados por Green [42]. (*Complexo 5 reportado por Files, et al, 2007 [83]; **Complexo 1 reportado por Yamamoto, et al, 2012 [9])

Os resultados mostraram que pequenas diferenças no ligante auxiliar causaram grandes mudanças no comportamento dos complexos de Co^{III} . Os melhores valores de IC_{50} contra linhagem de DLD-1 foram apresentados pelos complexos contendo derivado de cumarina-ácido hidroxâmico (**1**, **28** e **29**), nos quais a maior atividade foi exibida pelo complexo **1** ($31 \pm$

2 μM). Apesar desses três complexos apresentarem potenciais de redução muito negativos ($< -1,25 \text{ V vs EPH}$), eles apresentaram boa reatividade frente ao agente redutor ácido ascórbico, onde apenas **1** mostrou dependência de oxigênio. Os complexos **23**, **24** e **25** apresentaram potenciais dentro da faixa ideal para hipóxia ($-0,407$, $-0,329$ e $-0,396 \text{ V vs EPH}$), mas seu comportamento em meio redutor não foi avaliado. Para a série do ligante *Marimastat* (**5**, **26** e **27**), os autores observaram que a substituição do ligante TPA pelo TREN ou CYCLEN aumentou o pKa do *Marimastat* em uma faixa que permite que o complexo seja mais facilmente reduzido em um ambiente ácido do tumor. Todos os parâmetros discutidos no trabalho, que vão além dos mencionados aqui, levaram às considerações de que os recursos avaliados podem ser explorados para o desenvolvimento de pró-fármacos biorredutíveis que realizem a liberação do agente citotóxico de forma cada vez mais seletiva.

O interessante de utilizar moléculas fluorescentes é que, além do monitoramento da liberação do ligante em meio redutor por emissão, eles funcionam como marcadores visuais em meio de cultura. Assim é possível identificar a presença do fluoróforo livre em células tratadas com o respectivo complexo. Derivados de cumarina e antraquinona foram usados por Kim e colaboradores [36], para elaboração de pró-fármacos biorredutíveis. Os autores propuseram duas moléculas contendo um centro metálico de Co^{III} com uma amina equatorial tetradentada (CYCLAN) e dois ligantes fluorescentes na posição axial de cada complexo (Figura 12).

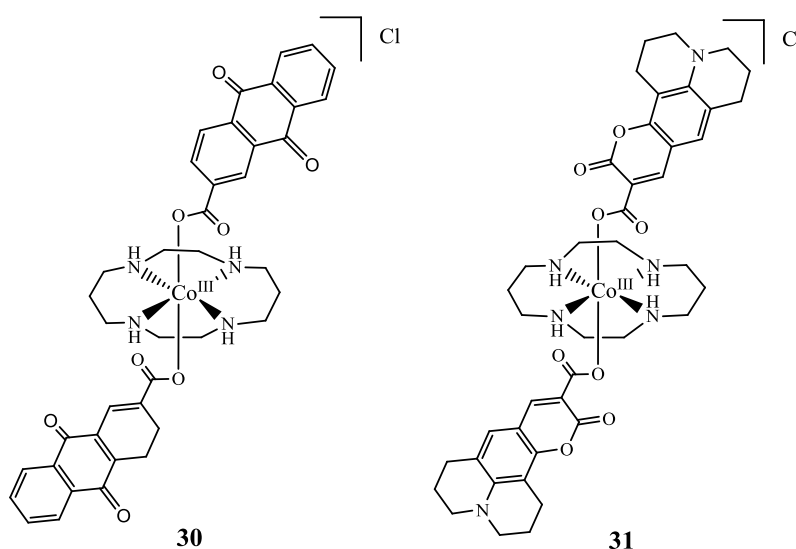


Figura 12: Estruturas estudados por Kim [36]. Onde **30** (com IC_{50} $20,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (hipóxia) e $35,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (normóxia)); e **31** (com IC_{50} $1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (hipóxia) e $1,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (normóxia)).

A distribuição do ligante foi acompanhada em meio celular tratado com os complexos. Esses ensaios foram estabelecidos pelos próprios autores do trabalho e mostraram que os complexos liberam os ligantes dentro das células e melhoram a distribuição dos mesmos quando comparados com sua forma livre. Os potenciais de redução foram ambos dentro da faixa para hipóxia, com valores de onda catódica iguais a $-0,38$ V para o complexo **31** e $-0,25$ V (*vs* EPH) para o complexo **30**, sendo associados ao processo $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$. As atividades dos complexos contra carcinoma de cólon DLD-1 foram melhores que dos respectivos ligantes livres e do precursor $[\text{CoCl}_2(\text{CYCLAN})]\text{Cl}$ ($> 95 \mu\text{M}$). A citotoxicidade reportada em IC_{50} foi determinada tanto em ambiente de normóxia quanto de hipóxia e os valores estão indicados na Figura 12. Apesar da baixa atividade da antraquinona livre, os autores observaram seletividade desse ligante à hipóxia ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$ em normóxia e $99 \pm 4 \mu\text{M}$ em hipóxia), a qual foi associada com a capacidade de formação de um ânion radical intermediário pela redução da quinona [86,87], além da sua capacidade de intercalar com o DNA [88,89]. Em todos os casos a coordenação do ligante melhorou a citotoxicidade e, segundo os autores, a menor atividade observada para **30** em comparação com **31** pode estar associada à rápida liberação do ligante (resultados observados em experimentos de redução), diminuindo, assim, os níveis de pró-fármaco capazes de entregar a antraquinona.

Renfrew, et al. apresentaram um sistema transportador de Co^{III} e Ru^{II} contendo β -dicetonados, incluindo curcumina, e TPA ativados por processo de redução do metal [47]. Apesar do grande potencial anticâncer das curcuminas, sua baixa biodisponibilidade e baixa estabilidade no soro sanguíneo leva a busca por modificações químicas que melhorem suas propriedades farmacológicas [17-19]. Assim, o objetivo dos autores foi de superar as limitações enfrentadas por essa classe de moléculas e avaliá-las na forma coordenada para serem entregues a um alvo celular específico. Os complexos obtidos e estudados estão representados na Figura 13.

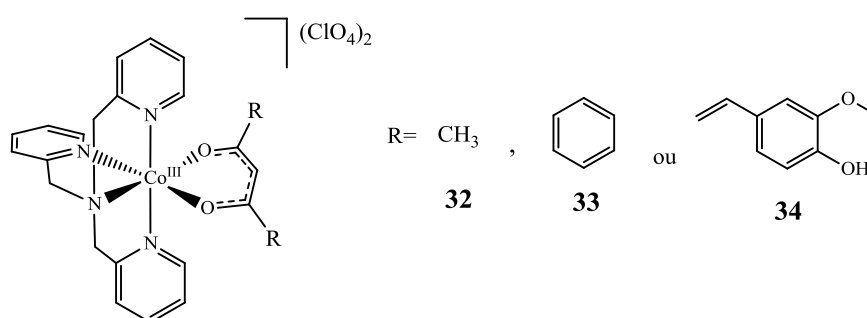


Figura 13: Estrutura dos complexos de Co^{III} obtidos e estudados por Renfrew, et al., 2013.

A citotoxicidade dos compostos frente à linhagem de células DLD-1, onde os valores de IC_{50} foram de $>200 \mu\text{M}$, $29 \pm 2 \mu\text{M}$ e $39 \pm 4 \mu\text{M}$ para **32-34**, respectivamente. A curcumina livre apresentou uma atividade maior que do seu respectivo complexo (**34**), IC_{50} de $13 \pm 2 \mu\text{M}$, entretanto, ensaios em esferoides acompanhados por microscopia confocal mostraram que a distribuição da curcumina é mantida nas regiões periféricas (células normóxia). Já o complexo **34** exibiu uma difusibilidade melhor para o centro do esferoide, atingindo as células com hipóxia simulada, e indicando a liberação do ligante pela emissão de fluorescência. Estudos da fluorescência conduzida na presença de agente redutor e análises por absorção de raios X para determinar as espécies químicas presentes após a redução do Co^{III} em célula tumoral, mostraram que a liberação do ligante no meio celular ocorre por mecanismo redox do cobalto. A melhor distribuição da curcumina livre em células hipóxicas exibida pelo complexo **34**, somado ao mecanismo que envolve a liberação do ligante, conduzem a uma boa proposta de pró-fármaco ativado por hipóxia.

A propriedade de emissão do ligante não é um pré-requisito para os ensaios de liberação. Bustamante e colaboradores monitoraram a dissociação do ligante de seus complexos de Co^{III} por UV-Vis em três pH diferentes (6,2, 7,0 e 7,4) e em três condições atmosféricas (saturado de argônio, atmosfera normal e saturada com O_2) [49]. As estruturas dos complexos de Co^{III} estudadas compreendem em um ligante naftoquinona e uma amina auxiliar (Py₂en e Py₂enMe), como representado na Figura 14.

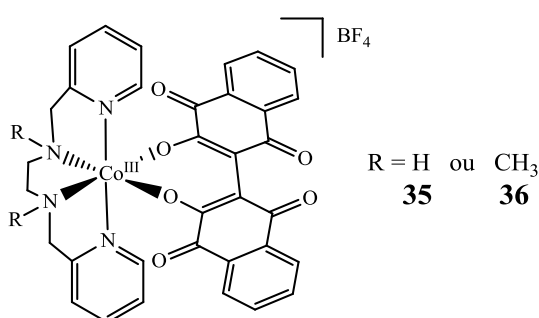


Figura 14: Representação das estruturas estudadas por Bustamante [49].

Os ensaios de liberação mostraram um comportamento particular para os complexos. **35** apresentou uma dissociação mais rápida em meio desoxigenado (atmosfera de argônio) e mais

lenta em atmosfera saturada com oxigênio. Esse dado é comum, visto que a literatura já estabelece a possibilidade de reoxidação do Co^{II} formado pela presença de O_2 . Contudo, para o complexo **36** a dissociação do ligante foi similar nas três atmosferas estudadas, indicando que não há dependência da concentração de oxigênio. Os autores propõem duas possíveis explicações para este resultado: i) o potencial de meia onda do complexo **36** é mais deslocado para regiões catódicas, o que pode sugerir que a espécie de Co^{II} formada após a redução do Co^{III} seja um fraco agente redutor, impedindo a reoxidação por oxigênio; ii) o efeito estérico do grupo metila ligado ao átomo de nitrogênio do ligante Py_2enMe pode dificultar a transferência de elétrons por esfera externa entre o O_2 e a espécie de Co^{II} formada.

Bases de Schiff também são bastante empregadas na química de coordenação. Garcia e colaboradores estudaram dois complexos de Co^{III} contendo ligante N,N,S e N,N,O doadores (tiosemicarbazona e semicarbazona, respectivamente) como modelos de pró-fármacos biorredutíveis [35]. Os complexos são mononucleares e contêm dois ligantes tridentados derivados de base de Schiff (Figura 15).

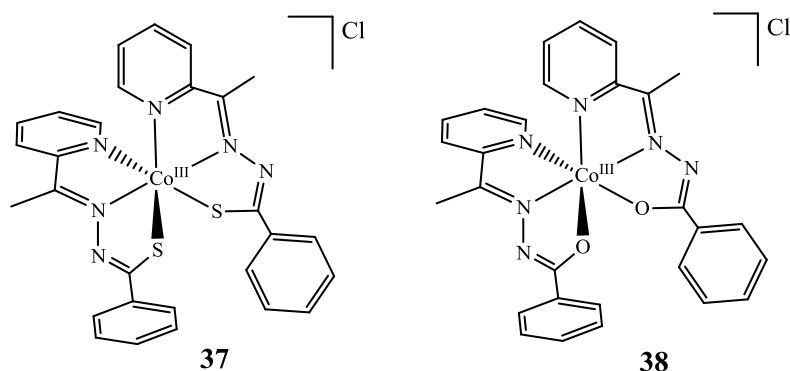


Figura 15: Representação dos complexos estudados por Garcia [35].

Os potenciais referentes ao processo $\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}}$ foram de $-0,73 \text{ V}$ e $-0,32 \text{ V vs EPH}$ para o complexo **37** e **38**, respectivamente. Os ensaios de liberação foram monitorados por UV-Vis, onde o decréscimo da banda de TC do complexo indicou a presença do ligante livre. Os ensaios incluíram o uso de ditionito de sódio como agente redutor e mostraram que apenas o complexo **38** é capaz de liberar o ligante imediatamente após a adição do redutor. Além disso, ensaios feitos em solução tampão mostraram que os dois complexos são estáveis dentro de 24 h.

Três novos complexos de cobalto contendo ligante azido (N_3^-) e aminas tripodais foram sintetizados e estudados dentro da proposta de pró-fármacos biorredutíveis por Pires e colaboradores [27]. Um dos complexos contém o cobalto no estado +3, mostrado na Figura 16, sendo capaz de liberar o ligante N_3^- após a redução do complexo por ácido ascórbico. Os autores ainda propõem possíveis estruturas formadas após a formação da espécie de Co^{II} (Figura 16).

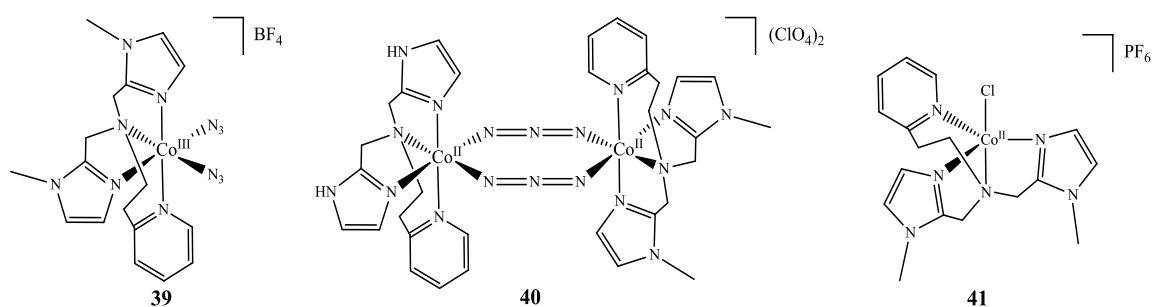


Figura 16: Estruturas dos complexos estudados por Pires, et al, 2016, onde **39**: pró-fármaco biorredutível; **40** e **41** são modelos para a forma reduzida da pró-fármaco [27].

Neste trabalho, a liberação do ligante foi acompanhada por espectroscopia no UV-Vis e os autores observaram que após a redução do metal o espectro de absorção ficou muito similar aos espectros dos complexos **40** e **41** em tampão fosfato, corroborando para a proposta das estruturas de Co^{II} . Os potenciais de redução variaram na ordem de **41** > **40** > **39**, devido ao caráter doador do íon azido ser mais pronunciado do que o Cl^- .

Uma proposta estrutural ligeiramente diferente para pró-fármacos biorredutíveis foi feita por Downward e colaboradores [90], que estudaram uma estrutura heterodimérica de Ru^{II} e Co^{III} como modelo de pró-fármacos fotoativados. O complexo **42**, representado na Figura 17, exibiu redução do Co^{III} ao Co^{II} por fotoindução e subsequente liberação dos ligantes derivados de amina.

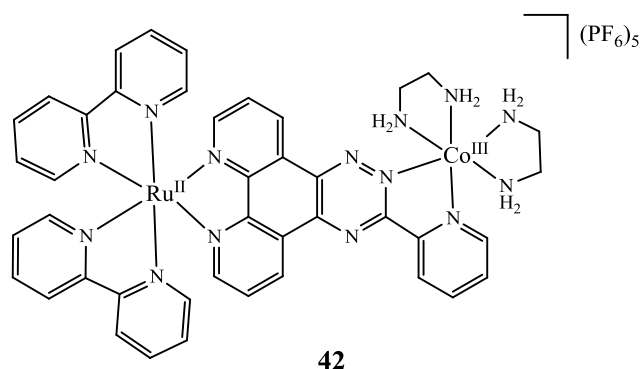


Figura 17: Estrutura heterodimérica do complexo **42** [90].

Os autores mostraram que a redução do Co^{III} ocorre devido à presença da porção do complexo de Ru^{II} , o qual absorve a radiação de 440 nm passando para o estado excitado, transfere elétron para o Co^{III} , que, por sua vez, passa para sua forma mais lábil (Co^{II}) e libera o ligante em seguida. A relação do dímero com os estudos de pró-fármacos biorredutíveis é que a liberação do ligante foi mais eficiente em meio desoxigenado (atmosfera de $\text{N}_{2(\text{g})}$ usada pelos autores), podendo ser seletivo à hipóxia. Apesar dos autores não apresentarem ensaios de citotoxicidade com o complexo, eles propuseram uma estrutura que pode ser mais explorada em outros trabalhos como pró-fármaco ativado por uma foto-biorredução.

Os estudos de complexos de Co^{III} contendo ligantes com propriedades biológicas têm contribuído bastante para o crescimento da pesquisa sobre tratamento de células tumorais com regiões de hipóxia. A escolha do ligante, o estado de oxidação do metal bem como grupos substituintes que modificam o potencial de redução do complexo são pontos cruciais na elaboração de uma estrutura promissora para essa classe de drogas. Contudo, obter espécies estáveis que se comportem de maneira ideal no meio biológico é um dos maiores desafios da química medicinal, sendo cada trabalho muito importante para a evolução dos resultados futuros.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e Métodos

Os solventes MeOH, DMSO, éter etílico, EtOH, acetona, acetonitrila (Vetec) e DMF seco (anhydrosolv – TEDIA), e os reagentes Et₃N (Aldrich), TPA (Aldrich), Co(ClO₄)₂·6H₂O (Aldrich) e ascorbato de sódio (Aldrich) foram usados sem tratamento prévio. O solvente MeOH (Vetec) foi previamente seco de acordo com a metodologia reportada na literatura [91], para a tentativa de síntese do complexo [Co^{III}(L)(TPA)](ClO₄)₂, **2b-Co^{III}**. O ligante Py₂en foi sintetizado de acordo com metodologia descrita [49,92] e gentilmente cedido pelo laboratório Bio&Nano da UFF, Niterói, coordenado pelo Prof. Maurício Lanznaster. O ligante **HL** derivado de cumarina, foi sintetizado pelo aluno de pós-graduação Felipe Vitório do Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal da UFRRJ – LaDMol-QM – coordenado pelo Prof. Dr. Arthur Eugen Kümmerle de acordo com metodologia reportada na literatura [12]. O tampão fosfato (10 mM, 0,025 mol L⁻¹ de NaCl), pH 7,4, foi preparado com 0,006 mol de NaH₂PO₄·6H₂O (Aldrich) e 0,0018 mol de Na₂HPO₄ (Aldrich), contendo NaCl (Vetec) para correção da força iônica a 0,05 mol L⁻¹, em um balão de 250 mL.

A pureza dos complexos foi avaliada através da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) em um analisador Perkin-Elmer CHN 2400 na Central Analítica de Microanálise - Instituto de Química da Universidade Federal de São Paulo, Brasil. O ponto de fusão dos complexos [Co^{II}(L)(TPA)]ClO₄ **1b-Co^{II}** e [Co^{III}(L)(Py₂en)](ClO₄)₂ **2c-Co^{III}** e do ligante **HL** foi medido em um aparelho AAKER PMF II, no Departamento de Química da UFRRJ. A condutividade molar dos complexos **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}** foi determinada em DMF espectroscópico, a 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ e temperatura ambiente em condutivímetro Ion 120W microprocessor, no Departamento de Química da UFRRJ.

3.2. Espectroscopia

Os espectros de RMN de ¹H (1D e 2D - ¹H X ¹H COSY) de **2b-Co^{III}**, **2c-Co^{III}** e **HL** e de RMN de ¹³C (uni e bi-dimensional) de **2c-Co^{III}** foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker Ultrashield Plus (500 MHz e 125 MHz, respectivamente), em DMSO-d₆, no Departamento de Química da UFRRJ, onde os deslocamentos químicos estão referenciados em parte por milhão (ppm) com relação ao padrão interno Met₄Si. Os espectros foram interpretados utilizando o programa ACD ¹D NMR Manager.

A espectroscopia na região do UV-Vis para os complexos **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}** e para o ligante **HL** foi realizada em um espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu, à temperatura ambiente, com varredura de 800 a 200 nm e resolução de 1 nm, no Departamento de Química da UFRRJ. Os espectros foram obtidos em DMF espectroscópico e tampão fosfato (pH 7,4). A absorvidade molar (ϵ) dos complexos e do ligante foi determinada em ambos solventes (DMF e tampão fosfato) a partir da diluição de suas soluções estoques (a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em DMF espectroscópico. As soluções dos compostos foram medidas em duplicatas de seis concentrações diferentes, entre $2,0 \times 10^{-6}$ e $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e o valor de ϵ foi determinado a partir da lei de Lambert-Beer, por regressão linear.

Os espectros na região do infravermelho de **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}**, **2c-Co^{III}** e **HL** foram obtidos no modo ATR com resolução de 1 cm^{-1} em espectrofotômetro FT-IR Bruker Vertex 70, no Departamento de Química da UFRRJ, e atribuídos os valores de número de onda em cm^{-1} .

As análises de espectroscopia de massas do complexo **2c-Co^{III}** e do ligante **HL** foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas (LAMEM) do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense. Os dados dos espectros foram obtidos em Espectrômetro de Massas Single-Quad/ESI/APCI acoplado a um Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC-MS) Flexar SQ-300 MS da Perkin Elmer no modo positivo. Os espectros foram obtidos a partir de uma solução metanólica dos compostos a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, contendo 2% de DMSO, onde o complexo **2c-Co^{III}** foi analisado na ausência e na presença de excesso de ascorbato de sódio.

3.3. Difração de Raios X

As estruturas cristalinas do ligante **HL** e do complexo **1b-Co^{II}** foram determinadas por Difração de Raios X de monocristais no Laboratório de Difração de Raios X da UFF (LDRX), no Instituto de Física, pelo Prof. Guilherme Pereira Guedes. Os dados foram coletados em difratômetro Bruker D8 Venture usando radiação de grafite-monocromado de Mo $K\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) à temperatura ambiente. Os parâmetros da medida e dos cristais estão resumidos na Tabela 9 (Anexo). A coleta de dados, o refinamento da célula e a redução dos dados foram feitos com Bruker Instrument Service v4.2.2, APEX2 e SAINT, respectivamente [93,94]. A correção da absorção usando reflexão equivalente foi realizada com o programa SADABS [95]. A solução da estrutura e as bases de refinamento full-matrix least-squares sobre F^2 foram

feitos com os programas SHELXS-97 e SHELXS-2014 [96]. Todos os átomos, exceto os átomos de hidrogênio, foram anisotropicamente refinados. Os átomos de hidrogênio foram tratados usando um refinamento forçado. Os desenhos das estruturas foram gerados no programa MERCURY [97].

3.4. Cálculos computacionais

Os estudos computacionais dos complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** e do ligante **HL** foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Fábio Miranda, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense.

Todos os cálculos foram realizados no software Turbomole 6.6 [98] e no nível PBE0/def2-TZVP/COSMO para os complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** e para o ligante **HL** [99]. Os cálculos de otimização das geometrias dos compostos foram realizados com método teórico de densidade funcional PBE combinado com o conjunto de bases def2-SVP [100,101]. A estabilidade das geometrias otimizadas foi confirmada por cálculo de frequência harmônica, uma vez que não foram encontradas frequências imaginárias ou negativas. As estruturas de **1b-Co^{II}** e **HL** foram otimizadas a partir dos dados de difração de raios X e de **2c-Co^{III}** baseada em estruturas reportadas na literatura [49,102]. Os cálculos foram realizados considerando-se o efeito do solvente (água, constante dielétrica (ϵ) = 78,3553 e índice de refração (n) = 1,333), usando o modelo de seleção de condutores COSMO [103].

As energias de excitação eletrônicas verticais foram realizadas em 50 estados para encontrar as transições mais importantes e os espectros teóricos foram ampliados com uma largura de banda a meia altura de 30 nm por uma função de Lorentz. Frequências vibracionais das ligações dos complexos e do ligante, o orbital molecular canônico e as superfícies de densidade de rotação foram plotadas com isocontornos de 0,02 u.a. no software Chemcraft 1.8 [104].

3.5. Voltametria cíclica

Os processos redox do ligante **HL** e dos complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** foram estudados por voltametria cíclica em um potentiostato–galvanostato BASi-Epsilon. Os voltamogramas foram obtidos em DMF seco a concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, temperatura ambiente e sob atmosfera de argônio (borbulhando-se argônio nas soluções por

10 minutos antes de cada medida). Foram utilizados Ag/AgCl como eletrodo de referência (ER), carbono vítreo como eletrodo de trabalho (ET), eletrodo auxiliar (EA) de platina e perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) a 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Ferroceno foi usado como referência interna (Fc/Fc⁺ = +0,72 V vs eletrodo normal de hidrogênio) [105]. Os voltamogramas foram medidos na faixa de 0,4 a -1,8 V e em velocidades de 50, 100, 150 e 200 mV s⁻¹, no Laboratório Bio&Nano, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense.

3.6. Reatividade do complexo **2c-Co^{III}** frente ao ascorbato de sódio

Estudos de estabilidade e reatividade do complexo **2c-Co^{III}** foram realizados por espectroscopia de fluorescência no Espectrofluorímetro Edinburgh FLS980, no Laboratório de Fotoquímica Molecular (LFQM) do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense. Os espectros de emissão foram obtidos a 37 °C, na faixa de 460 a 700 nm para **HL** e **2c-Co^{III}**, sendo irradiados no comprimento de onda de 450 nm.

A reatividade do complexo frente ao ascorbato de sódio (10x de excesso) foi estudada em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1% de metanol, para simular o pH fisiológico. Soluções estoque do complexo (1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹) e de ascorbato de sódio (1,0 x 10⁻² mol L⁻¹) foram previamente preparadas em metanol espectroscópico e água destilada, respectivamente. Essas soluções foram diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) a uma concentração final de 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ para o complexo e 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ para o ascorbato de sódio. O monitoramento da emissão de **2c-Co^{III}** em presença de excesso de ascorbato foi feito por 8,5h sob atmosfera de argônio e atmosfera normal, com espectros medidos a cada 30 min. Uma solução contendo apenas o complexo a 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, em tampão fosfato e sob atmosfera normal foi avaliada por 8,5h a fim de estudar a estabilidade da molécula em solução.

Para o ligante **HL**, uma solução estoque (1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹) foi previamente preparada em metanol espectroscópico e diluída em tampão fosfato a 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ para medida do seu espectro de emissão.

3.7. Ensaios de citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica, em termos de concentração inibitória de 50% da viabilidade celular – IC₅₀, do ligante **HL** e dos complexos **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}** foi realizada no

Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em colaboração com a Prof^a Heveline Silva, seguindo procedimento padrão descrito na literatura [106]. Foram utilizadas linhagens de células tumorais B16-F10 (célula de melanoma murino metastático), 4T1 (célula de carcinoma mamário murino) e BHK-21 (célula não tumoral de rim de hamster). As diferentes linhagens celulares utilizadas foram devidamente propagadas em meio de cultura RPMI 1640, pH 7,4, suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, Hepes (4,0 mmol/L), NaHCO₃ (14,0 mmol/L), ampicilina (0,27 mmol/L) e estreptomicina (0,06 mmol/L) em atmosfera úmida e 5 % (v/v) de CO₂. As células foram recolhidas após serem lavadas com tampão PBS/EDTA pH 7,4 e desprendidas da superfície da garrafa de cultivo com solução de tripsina 0,02 % (v/v). A tripsina foi inativada com adição de 1,5 mL de meio de cultura (10% FBS).

Para determinação da viabilidade celular foi feita a distribuição das células em meio de cultura RPMI 1640, adicionado de soro fetal bovino 10% v/v, em densidades de $0,5 \times 10^3$ (BHK-21), $1,5 \times 10^3$ (B16F10) e $2,0 \times 10^3$ (4T1) células/poço/100 μ L em placas de 96 poços e foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO₂ por 24 h para total aderência. Nos poços das placas contendo as células aderidas, foram distribuídos 100 μ L de concentrações decrescentes (100 a 0,1 μ M) do composto a ser testado, em quadruplicatas. Para controle negativo foi utilizado 100 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de FBS.

Após exposição por 72 h aos compostos, as células foram incubadas com MTT (5 μ g/10 μ L/poço) por 4 h. Em seguida, o sobrenadante foi removido por aspiração e 100 μ L de DMSO/poço foram adicionados. A viabilidade celular é determinada pela medida da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas, sendo proporcional à concentração de sais de formazan – produto da redução mitocondrial do MTT nas células viáveis [107] (Figura 18).

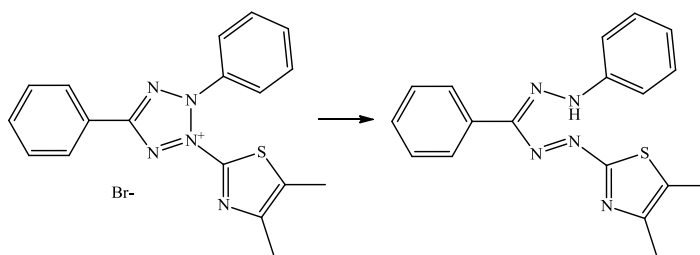


Figura 18: Redução do MTT para formação do formazan.

3.8. Síntese dos complexos

3.8.1. Complexo $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})(\text{TPA})]\text{ClO}_4$, **1b-Co^{II}**

O complexo **1b-Co^{II}** foi previamente sintetizado por nosso grupo [108], segundo metodologia adaptada da literatura [49, 109]. O esquema de síntese encontra-se representado na Figura 19.

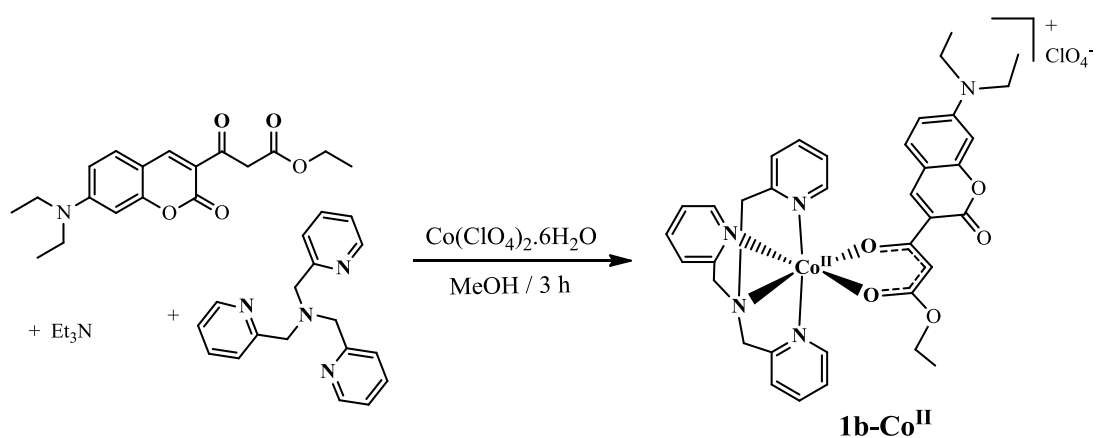


Figura 19: Esquema de síntese para o complexo **1b-Co^{II}**, realizada em temperatura ambiente e protegido da luz.

A uma solução amarela contendo 97 mg (0,30 mmol) do ligante **HL** em 15 mL de metanol e 41 µL de Et₃N (0,30 mmol), adicionou-se uma solução rósea contendo 89 mg (0,30 mmol) de TPA e 109 mg (0,30 mmol) de Co(ClO₄)₂·6H₂O em 10 mL de metanol. O sistema foi mantido sob agitação, protegido da luz e à temperatura ambiente por 3 h. Ao final da reação, o balão foi mantido sob refrigeração e cristais vermelhos foram obtidos após seis dias por evaporação lenta do solvente. Os cristais foram filtrados e lavados com etanol gelado.

*Perclorato de etil 3-(7-(dietilamina)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato-tris(piridinil-2-metil)aminacobalto (II), **1b-Co^{II}**.*

P.F.: 150 °C. Rendimento: 229 mg, 57%. IV (ATR): 2977/2933/2902 (νC-H de CH₂/CH₃), 1714 (νC=O_{lactona}), 1612 (νC-O_{β-dicetonato}+νC=C), 1591/1568 (νC=N+νC=C), 1501/1485/1445 (νC=C), 1266 (νC-O_{éster}), 1074 (νCl-O), 621 (δO-Cl-O). Análise elementar de CHN: Encontrado: C, 55,38, H, 5,05; N, 8,80%. Calculado para: C, 55,50; H, 4,92; N,

8,99%). UV-Vis [DMF; λ/nm ($\epsilon/\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 438 (36.232). [DMF/tampão fosfato (pH = 7,4); λ/nm ($\epsilon/\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 448 (37.930) Condutividade: Ω_{M} [DMF] = 73,9 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Eletrólito do tipo 1:1) [110].

3.8.2. Complexo $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})(\text{TPA})](\text{ClO}_4)_2$, **2b-Co^{III}**

O complexo **2b-Co^{III}** foi sintetizado a partir do precursor de Co^{III} , $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$, em duas etapas, de acordo com procedimentos adaptados da literatura [44,111] (Figuras 20 e 21).

1ª Etapa: Síntese do precursor $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$

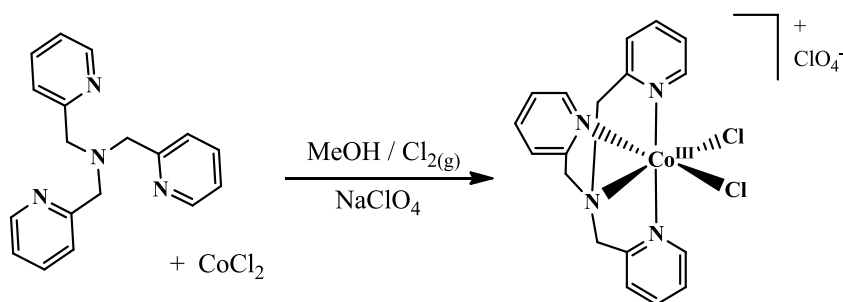


Figura 20: Esquema de síntese do precursor de Co^{III} , $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$, realizada em atmosfera de Argônio.

Em um balão completamente seco adicionou-se 100 mg de TPA (0,30 mmol), 45 mg de CoCl_2 anidro (0,30 mmol) e 7 mL de metanol espectroscópico, observando-se a formação de uma solução verde. O sistema foi mantido fechado e com atmosfera de argônio. Através de uma vidraria acoplada, promoveu-se a geração de gás cloro no meio reacional a partir da reação entre $\text{NaClO}_{(\text{s})}$ e solução aquosa de HCl 20%, levando a mudança da cor verde para roxo após 5 min. Ao final da reação, adicionou-se 84 mg (0,60 mmol) de NaClO_4 , obtendo-se cristais roxos por evaporação lenta da mistura reacional em seis dias. Os cristais foram lavados com água até um pequeno aumento do pH da solução de lavagem (pH ~ 6) e secos em dessecador. Rendimento: 45%.

2ª Etapa: Síntese do complexo $[Co^{III}(L)(TPA)](ClO_4)_2$, **2b-Co^{III}**

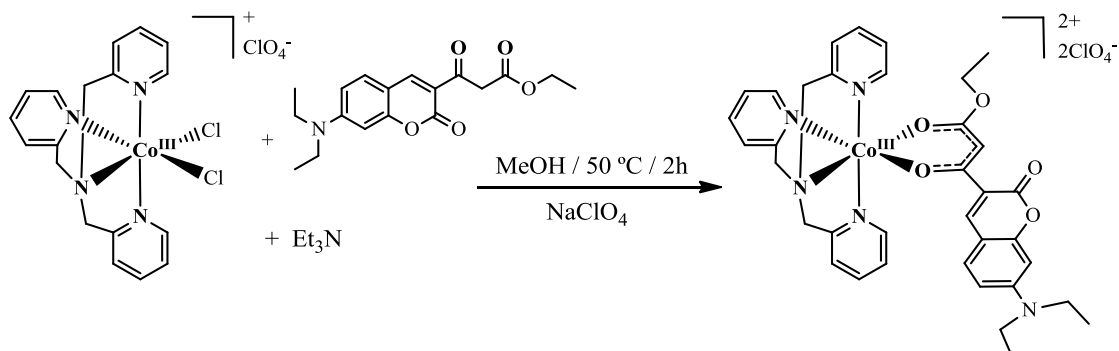


Figura 21: Esquema de síntese do complexo **2b-Co^{III}**.

Foi preparada uma suspensão contendo 70 mg (0,15 mmol) do precursor $[Co(TPA)Cl_2]ClO_4$ em 5 mL de MeOH seco. Em seguida, adicionou-se 48 mg (0,15 mmol) do ligante **HL** e 23 μ L (0,18 mmol) de Et_3N . O sistema foi mantido em banho-maria a 50 °C por 2 h. Ao final da reação, adicionou-se 10 mL de éter etílico na solução, onde o precipitado foi isolado por centrifugação e o sobrenadante armazenado. Sobre o precipitado, foi adicionado 5 mL de solução aquosa 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ seguido de acetona até solubilização total. A solução foi mantida a temperatura ambiente e um sólido marrom cristalino foi obtido após evaporação lenta do solvente (sólido 1). O sobrenadante armazenado foi totalmente evaporado e sobre o sólido, adicionou-se 10 mL de éter etílico e o mesmo procedimento descrito acima foi reproduzido. Um sólido marrom cristalino (sólido 2) e monocristais amarelados foram obtidos após evaporação do solvente da mistura H_2O /acetona.

Perclorato de etil 3-(7-(dietilamina)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato-tris(piridinil-2-metil)aminacobalto (III), 2b-Co^{III}

Massa obtida: 4,5 mg (sólido 1) e 22,5 mg (sólido 2). RMN de 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) realizado com sólido 2: δ 9,22 (d, 1H, H_{py} complexo); 9,00 (s, 1H, H_4 complexo); 8,92 (d, 0,75H, H_{py} -precursor); 8,56 (s, 0,5H, H_4 ligante livre); 8,45 (d, 2H, H_{py} complexo); 8,39 (d, 1,5H, H_{py} -precursor); 8,34 (*não atribuído*); 8,21-8,16 (m, 3,5H, H_{py} complexo); 8,05-8,01 (m, 2H, $H_{aromático}$); 7,95 (s, 0,5H, H_{DMF}); 7,84-7,79 (m, 6H, H_{py} -precursor); 7,70 (m, 0,7H, H_5 ligante livre); 7,66-7,63 (m, 4H, $H_5+H_{aromático}$ não especificado); 7,44-7,39 (*não atribuído*); 6,92 (d, 1H, H_6 complexo); 6,80 (m, 1,6H,

$H6_{\text{ligante livre}}$); 6,66 (s, 1H, $H8_{\text{complexo}}$); 6,58 (s, 0,8H, $H8_{\text{ligante livre}}$); 6,45 (s, 1H, $H11_{\text{complexo}}$); 6,23 (*não atribuído*); 6,10 (*não atribuído*); 5,63 (d, 1H, $J = 16,45$ Hz, $CH_2N_{TPA\text{-precursor}}$); 5,44 (d, 2H, $J = 16,68$ Hz, CH_2N_{complexo}); 5,34 (s, 2H, $CH_2N_{TPA\text{-precursor}}$); 5,29 (s, 1,5H, CH_2N_{complexo}); 5,12 (d, 3,5H, $J = 16,68$ Hz, CH_2N_{complexo}); 4,97 (d, 1H, $J = 16,45$ Hz, $CH_2N_{TPA\text{-precursor}}$); 4,23 (q, 2H, $H13_{\text{complexo}}$); 4,09 (m, 1,5H $H13_{\text{ligante livre}}$); 3,93 (s, 1H, $H11_{\text{ligante livre}}$); 2,89 e 2,73 (s, 1,3H, H_{DMF}); 1,19-1,06 (m, 17H, $H14+H16+H18_{\text{complexo}} + \text{ligante livre}$). IV (ATR) realizado com sólido 1: 3586 (vOH), 3123 (vC- $H_{\text{aromático}}$), 2981/2937 (vC-H CH_2/CH_3), 1704 (vC=O $_{\text{lactona}}$), 1613 (vC-O $_{\beta\text{-dicetonato}}$ +vC=C), 1590/1558 (vC=N+vC=C), 1482/1444/1423 (vC=C), 1281 (vC-O $_{\text{éster}}$), 1074 (vCl-O), 621 (δ O-Cl-O). Análise elementar de CHN (realizada com sólido 2): Encontrado: C, 38,67; H, 3,92; N, 6,38%. Calculado para $C_{36}H_{38}Cl_2CoN_5O_{13} \cdot 0,75C_{18}H_{22}Cl_3CoN_4O_{14} \cdot 0,5C_{18}H_{21}NO_5 \cdot 2,1NaClO_4 \cdot 0,4DMF$: C, 38,90; H, 3,71; N, 6,76%. (Onde $C_{36}H_{38}Cl_2CoN_5O_{13} = \mathbf{2b-Co^{III}}$; $C_{18}H_{21}NO_5 = \mathbf{HL}$; $C_{18}H_{22}Cl_3CoN_4O_{14} = [\mathbf{Co(TPA)(OH)_2}(ClO_4)_3]$).

3.8.3. Complexo $[\mathbf{Co^{III}(L)(Py_2en)(ClO_4)_2} \cdot 2H_2O, \mathbf{2c-Co^{III}}$

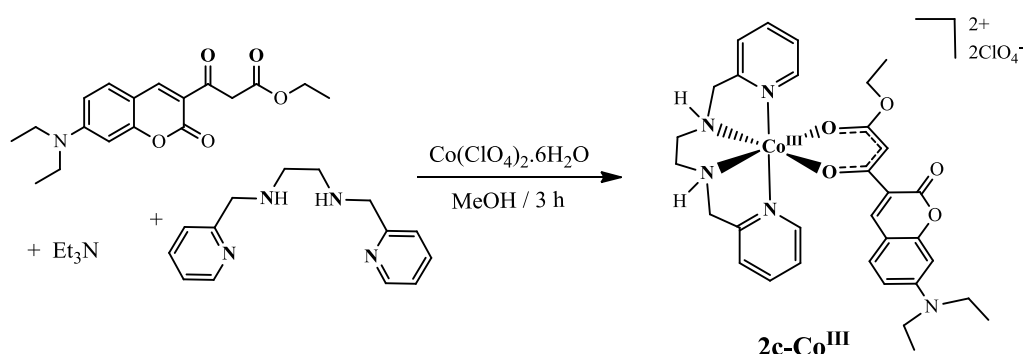


Figura 22: Esquema de síntese para o complexo $\mathbf{2c-Co^{III}}$, realizada em temperatura ambiente e protegido da luz.

A síntese do complexo $\mathbf{2c-Co^{III}}$ foi reproduzida, seguindo metodologia realizada previamente por nosso grupo [108]. Utilizou-se o mesmo método descrito para $\mathbf{1b-Co^{II}}$, substituindo-se o TPA pelo Py_2en (107 mg, 0,30 mmol). Ao final da reação, evaporou-se metade do solvente no rotaevaporador e o sólido laranja foi isolado por filtração, sendo lavado com metanol gelado e seco em dessecador.

Perclorato de 3-(7-(dietilamina)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato-N1,N2-bis(2-pyridilmetil)-1,2-diamino-etanocobalto(III) diidratado, $\mathbf{2c-Co^{III}}$.

Rendimento: 82 mg, 34%. $T_{\text{decomposição}}$: 245 °C. $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8,78 (s, 1H, $H4$); 8,32-8,24 (m, 4H, H_{Py2en}); 8,11 (s, 2H, NH); 7,84-7,76 (m, 4H, H_{Py2en}); 7,59 (d, $J = 9,09$ Hz, 1H, $H5$); 6,86 (d, $J = 9,09$ Hz, 1H, $H6$); 6,57 (s, 1H, $H8$); 6,31 (s, 1H, $H11$); 5,19 (dd, $J = 11,22$ e $24,02$ Hz, 1H, Hb'); 4,99 (dd, $J = 11,22$ e $24,02$ Hz, 1H, Hc'); 4,46-4,26 (m, 4H, $Hb+Hc+H13$); 3,50 (q, $J = 6,89$ Hz, 4H, $H15+H16$); 2,74-2,63 (m, 4H, $Ha,a'+Hd,d'$); 1,21 (t, $J = 7,10$ Hz, 3H, $H14$); 1,15 (t, $J = 6,89$ Hz, 6H, $H16+H18$). IV (ATR): 3601 ($\nu\text{N-H}$), 3225 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$), 2982 ($\nu\text{C-H } CH_2/CH_3$), 1713 ($\nu\text{C=O}_{\text{lactona}}$), 1617 ($\nu\text{C-O}_{\beta\text{-dicetonato}}$), 1590/1559 ($\nu\text{C=C}+\nu\text{C=N}$), 1484/1455/1424 ($\nu\text{C=C}$), 1292 ($\nu\text{C-O}_{\text{éster}}$), 1074 ($\nu\text{Cl-O}$), 623 ($\delta\text{O-Cl-O}$). Análise elementar de CHN: Encontrado: C, 44,40; H, 4,93; N, 7,90%. Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{CoN}_5\text{O}_{13}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 44,35; H, 4,89; N, 8,08%. UV-Vis [DMF; λ/nm ($\epsilon/\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 447 (51.997). [DMF/Tampão fosfato (pH = 7,4); λ/nm ($\epsilon/\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 455 (48.912). Condutividade: Ω_M [DMF] = 131,9 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Eletrólito do tipo 1:2) [110].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e Caracterização dos Complexos

4.1.1. Complexo 1b-Co^{II}

O complexo **1b-Co^{II}** foi sintetizado previamente pela aluna de Iniciação Científica Jéssica Assunção [108] de acordo com o esquema de síntese representado na Figura 23.

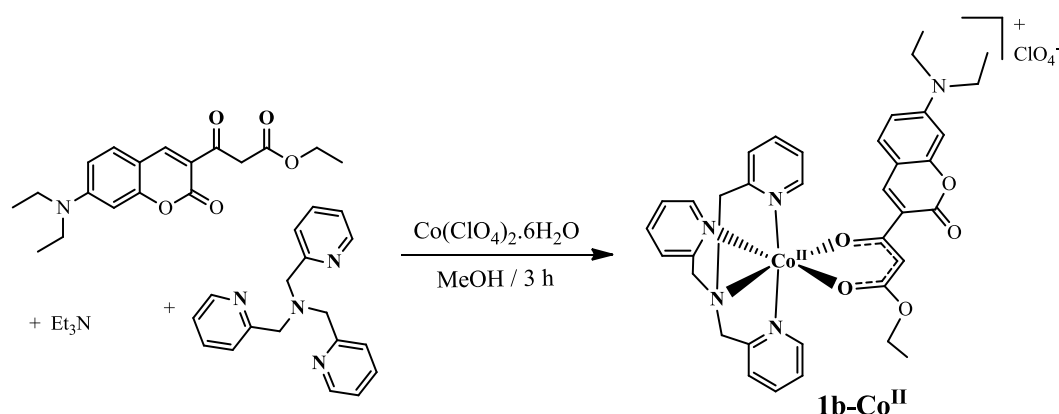


Figura 23: Esquema de síntese para o complexo **1b-Co^{II}**.

Na solução de **HL**, usou-se 1 eq. de Et₃N para promover a desprotonação do grupo β-cetoéster pois a forma desprotonada (**L¹⁻**) favorece a coordenação com o metal. A mistura de TPA com o metal foi preparada separadamente para levar inicialmente à formação de uma espécie intermediária do tipo [Co(TPA)(S)₂]²⁺, com a amina auxiliar ocupando quatro pontos de coordenação do cobalto (Figura 24a). Esta mistura foi adicionada ao ligante para substituição das moléculas de solvente por **L¹⁻**, como representado na Figura 24b. A ordem de adição foi escolhida com o objetivo de formar um complexo do tipo [Co(**L**)TPA]²⁺ e evitar a formação de espécies com proporções estequiométricas diferentes.

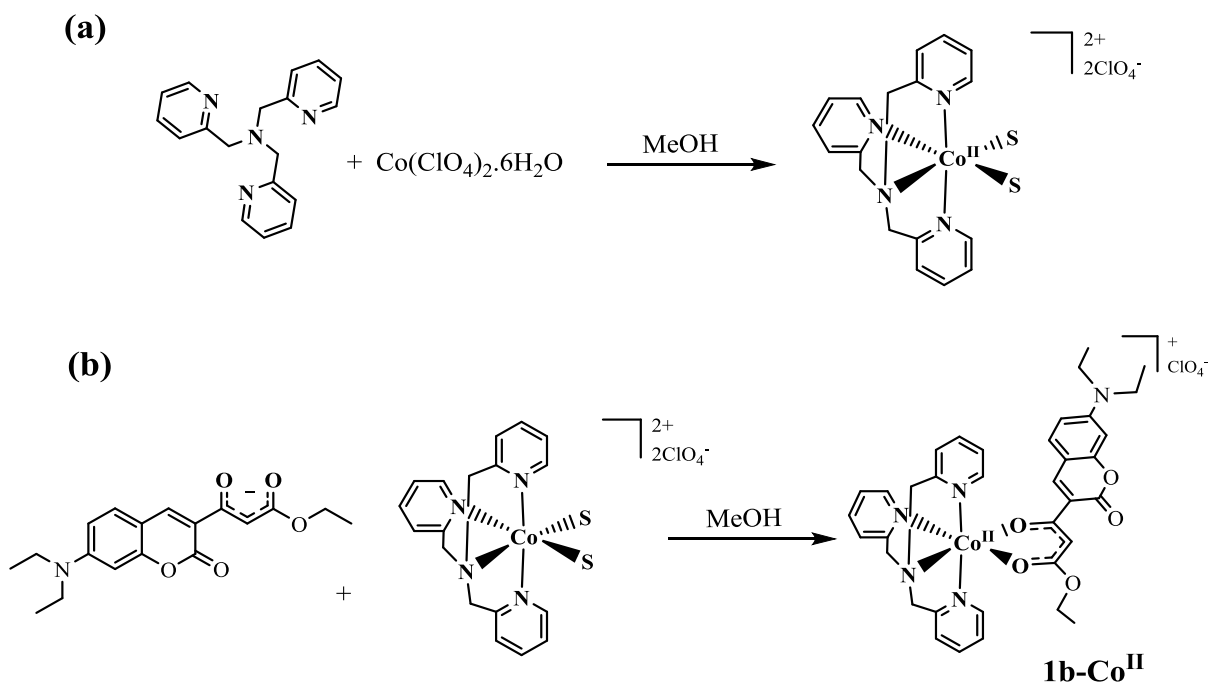


Figura 24: Esquema representando as possíveis etapas na formação do complexo **1b-Co^{II}**, onde (a) é a formação do $[\text{Co}(\text{TPA})(\text{S})_2]^{2+}$ e (b) a substituição das moléculas de solvente pelo ligante desprotonado.

O sistema reacional permaneceu aberto no intuito de promover a oxidação do íon Co^{II} ao Co^{III} pelo oxigênio atmosférico. No entanto, a difração de raios X dos cristais obtidos mostrou a formação do complexo de Co^{II} .

4.1.1.1. Determinação estrutural por difração de raios X

Monocristais de **1b-Co^{II}** foram obtidos por evaporação lenta da solução do complexo em metanol proveniente da reação. A estrutura molecular do complexo está representada na Figura 25. Monocristais amarelos do ligante **HL** também foram obtidos através da evaporação lenta de solução metanólica e sua estrutura cristalina encontra-se representada na Figura 26. Os principais comprimentos e ângulos de ligação do complexo **1b-Co^{II}** e de **HL** estão listados na Tabela 1. Dados de refinamento de ambos os cristais e os outros comprimentos de ligação de **HL** estão disponíveis no Anexo (Tabela 9 e 10, respectivamente).

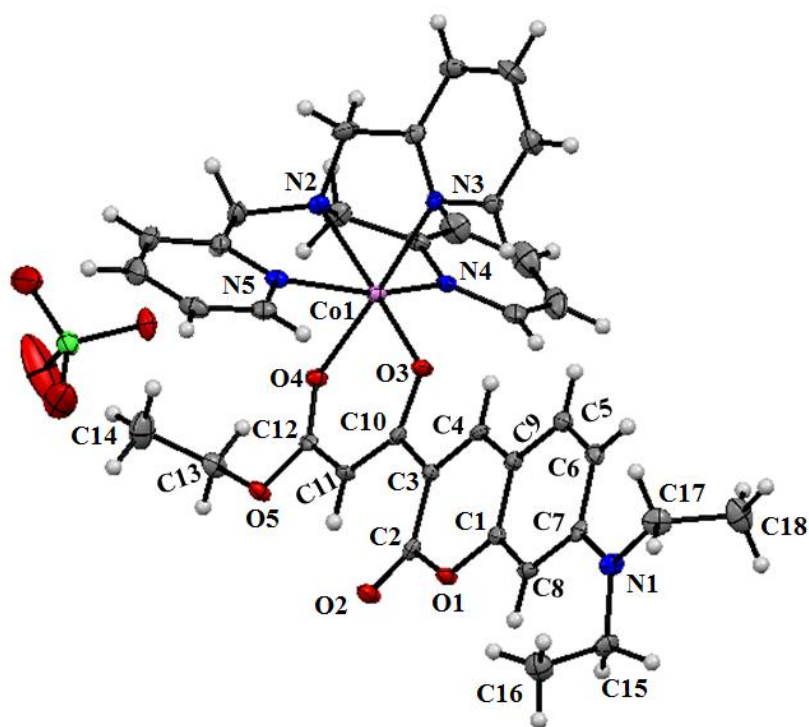


Figura 25: Unidade molecular do complexo **1b-Co^{II}**.

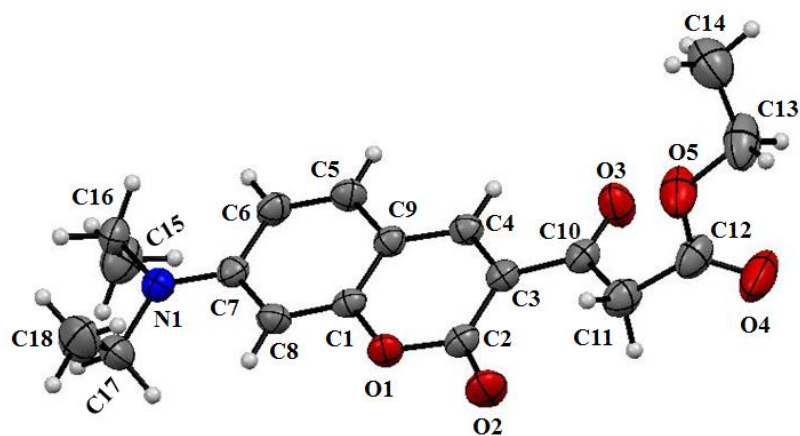


Figura 26: Unidade molecular do ligante **HL**.

O complexo **1b-Co^{II}** cristaliza no sistema monoclinico e apresenta grupo de espaço $P_{2_1/n}$, com parâmetros de célula unitária $a = 11,7110(7) \text{ \AA}$, $b = 16,8296(8) \text{ \AA}$, $c = 18,3872(10) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 105,963(2)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ e volume igual a $3484,2(3) \text{ \AA}^3$. Já o ligante **HL** apresenta um sistema triclinico de cristalização e grupo de espaço $P-1$, com parâmetros de célula

unitária $a = 7,7899(3) \text{ \AA}$, $b = 9,1682(4) \text{ \AA}$, $c = 13,2437(6) \text{ \AA}$, $\alpha = 88,782(2)^\circ$, $\beta = 74,144(2)^\circ$, $\gamma = 66,916(2)^\circ$ e volume igual a $833,066 \text{ \AA}^3$.

A unidade assimétrica do complexo **1b-Co^{II}** consiste de um cátion mononuclear de cobalto e um ânion perclorato. O cobalto é hexacoordenado e os ângulos de ligação envolvendo sua esfera de coordenação confirmam uma geometria octaédrica distorcida. O ligante na forma **L¹⁻** interage com o íon metálico de modo bidentado através dos átomos de oxigênio O3 e O4 da porção β -cetoéster, formando um anel estável de 6 membros com o cobalto (Co1/O3/C10/C11/C12/O4, ver Figura 25). A amina auxiliar, TPA, é tetracoordenada e está ligada ao metal através do nitrogênio do grupo amina (N2) e dos átomos de nitrogênio piridínico (N3, N4 e N5).

Os dados cristalográficos mostraram que o complexo assume um arranjo *trans* com relação aos átomos O3 do grupo ceto de **L¹⁻** e N2 do TPA, apresentando um ângulo de $171,21(9)^\circ$ entre N2–Co1–O3 (Tabela 1). Apesar da possibilidade de formação dos dois isômeros, **1b-Co^{II}** exibiu apenas essa conformação no estado sólido. A literatura reporta casos similares para complexos de Co^{III} contendo TPA e um ligante O,O doador β -dicetona em que o grupo mais volumoso do ligante (um ou dois anéis aromáticos) apresenta-se *cis* ao nitrogênio alifático do TPA [44]. Os autores puderam comparar com a conformação do complexo em solução por RMN de ¹H, que também indicou a formação de apenas um isômero. Os autores justificaram que a formação deste isômero foi devido ao impedimento estérico da piridina do TPA, fazendo com que o grupo mais volumoso do ligante O,O doador permanecesse *cis* ao nitrogênio do TPA menos impedido e mais distante das piridinas (mais impedido). Contudo, os autores obtiveram o mesmo resultado para complexos de Co^{III} contendo TREN como ligante auxiliar, cujos sítios de coordenação são quatro grupos aminas estericamente desimpedidos. Para esses complexos, os autores não puderam utilizar o mesmo argumento associado ao TPA, pois ambos os grupos aminas do TREN são estericamente similares.

Em outro caso, um complexo de Co^{III} contendo TPA e um ligante assimétrico O,O doador apresentou apenas um arranjo no estado sólido e dois isômeros de proporções iguais em solução, comprovado por espectroscopia de RMN. Neste trabalho os autores acreditam que o estado sólido pode apresentar as duas conformações, cristalizando de forma individual [83]. Para **1b-Co^{II}** a técnica de RMN torna-se inviável devido à configuração paramagnética do metal e, baseando-se somente nos resultados de DRX, o complexo não exibiu interações intramoleculares entre **L¹⁻** e TPA ou repulsões entre grupos volumosos que justificassem a

formação de um produto com um único arranjo. Certamente não há dados que comprovem a presença de outra conformação para o complexo, mas acredita-se que há grande possibilidade da formação do isômero *cis*. Cálculos de otimização geométrica para ambas formas estruturais podem auxiliar na justificativa dos dados obtidos no estado sólido.

A determinação da estrutura de raios X do complexo evidenciou a formação de uma espécie com o metal no estado de oxidação +2, principalmente pelos comprimentos de ligação M–L [112]. As distâncias observadas para as ligações Co–N_(TPA) no complexo **1b-Co^{II}** estão entre 2,105–2,175 Å, sendo similares a complexos de Co^{II} contendo ligantes polinitrogenados [112,113]. As ligações entre L⁻ e Co^{II} apresentaram comprimentos de 1,970(2) Å e 2,087(2) Å para Co1–O3 e Co1–O4, respectivamente. O estado de oxidação +2 para o Cobalto também foi confirmado pela presença do ligante na forma -1 e de apenas um ânion perclorato.

A determinação estrutural do ligante por difração de raios X permitiu a avaliação das principais modificações no seu arranjo após sua coordenação com Co^{II}. O primeiro aspecto observado foi a variação dos comprimentos de ligação entre os átomos envolvidos na complexação. No ligante livre, as ligações dos grupos carbonílicos C10=O3 e C12=O4 apresentam distâncias de 1,220(2) e 1,198(3) Å, respectivamente, e confirmam o caráter de ligação dupla entre os átomos de carbono e oxigênio. Após a coordenação de **HL**, o caráter π das ligações C–O é diminuído devido à sua forma desprotonada e à interação com o Co^{II}, apresentando distâncias de 1,294(4) e 1,245(4) Å, para C10–O3 e C12–O4, respectivamente, em **1b-Co^{II}**. Este resultado está de acordo com a literatura em que moléculas orgânicas contendo grupo 1,3-dicetonas que apresentam a forma enólica no estado sólido exibem distâncias de ligação em torno de 1,3 Å entre carbono e oxigênio na porção [C=C–O–H] [114]. Ainda no sítio de coordenação de L⁻, foi possível observar a variação no comprimento de ligação C10–C11, que apresentou valor de 1,513(3) Å na estrutura de **HL** livre e 1,383(4) Å após a complexação. Essa diminuição do comprimento corrobora com a formação do sítio [O=C–C=C–O⁻] (β -dicetonato). A ligação C11–C12 também sofreu diminuição em seu comprimento, ainda que menor, de 1,499(4) Å no ligante livre e 1,425(2) Å no complexo.

Em **HL**, o grupo ceto (C10=O3) apresenta um pequeno desvio de 7,1(3)° do plano que contém a cumarina [115,116] (C4–C3–C10–O3) (Tabela 1). Além disso, o grupo carbonila C12=O4 apresenta um desvio bem maior entre os átomos C10–C11–C12–O4, com ângulo de torção igual a 103,7(3)°. Esses ângulos de torção levam ao que assumimos como uma pseudo orientação *trans* das carbonilas do ligante. Contudo, a coordenação com metal leva a uma conformação mais planar de L⁻, onde os grupos C10–O3 e C12–O4 orientam-se de forma *cis*

e os ângulos de torção observados diminuem em grande escala para $2,25(5)^\circ$ entre C4–C3–C10–O3 e para $0,5(3)^\circ$ entre C10–C11–C12–O4. Essa característica é interessante porque pode influenciar na deslocalização eletrônica exibida pelo ligante. Recentemente, nosso grupo reportou os efeitos da planaridade de derivados de cumarina após sua complexação com Co^{III} sobre as transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ da molécula [109].

Tanto a estrutura cristalina de **HL** quanto de **1b-Co^{II}** são estabilizadas por interações intermoleculares fracas. **HL** apresenta também interações intermoleculares do tipo $\pi-\pi$ *stacking* entre os anéis cumarínicos de duas moléculas no empacotamento, comum para essa classe de compostos, onde a distância $\text{C}_{\text{sp}2}\dots\text{C}_{\text{sp}2}$ é de $3,373(3)$ Å (Figura 27). Essa distância está de acordo com sistemas contendo anel aromático [117], incluindo núcleos cumarínicos [115,118].

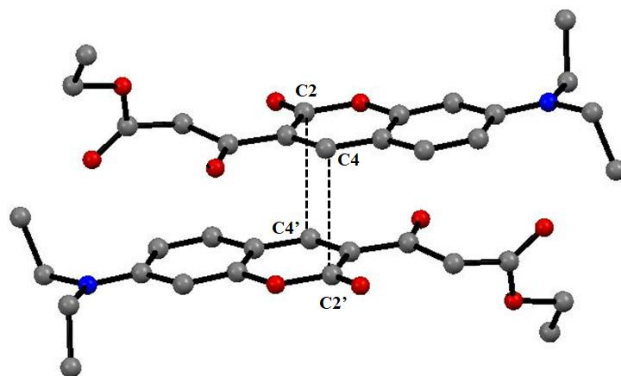


Figura 27: Empacotamento cristalino de **HL**, mostrando as interações intermoleculares $\pi-\pi$ *stacking* entre os anéis cumarínicos do dímero molecular. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para clareza da imagem.

Tabela 1: Principais comprimentos (Å) e ângulo (°) de ligação do complexo **1b-Co^{II}** e do ligante **HL** obtidos por DRX.

Átomos	Comprimento (Å)		Átomos	Ângulos (°)	
	1b-Co^{II}	HL^a		1b-Co^{II}	HL^a
Co1–O4	2,087(2)	-	O4–Co1–O3	91,31(8)	-
Co1–O3	1,970(2)	-	O4–Co1–N2	92,63(9)	-
Co1–N2	2,174(2)	-	O4–Co1–N5	85,16(9)	-
Co1–N3	2,104(3)	-	O4–Co1–N4	88,95(9)	-
Co1–N5	2,134(3)	-	O3–Co1–N3	94,66(9)	-
Co1–N4	2,128(3)	-	O3–Co1–N5	94,98(9)	-
C10–O3	1,294(4)	1,220 (2)	N3–Co1–N2	81,67(10)	-
C12–O4	1,245(4)	1,198 (3)	N2–Co1–N5	77,54(10)	-
C2–O2	1,213(4)	1,206 (2)	N2–Co1–N4	79,17(10)	-
C11–C10	1,383 (4)	1,513 (3)	N3–Co1–N5	95,89(9)	-
C11–C12	1,425 (2)	1,499 (4)	N3–Co1–N4	87,62(10)	-
			N5–Co1–N4	155,66(10)	-
			O3–Co1–N2	171,21(9)	-
			O3–Co1–N4	108,77(9)	-
			C10–C11–C12–O4	0,5(3)	103,7 (3)
			C4–C3–C10–O3	2,2(5)	7,1 (3)

^a Outros comprimentos e ângulos referentes a estrutura de **HL** estão em anexo na Tabela 10.

4.1.1.2. Espectroscopia na região do infravermelho

Os compostos **1b-Co^{II}** e **HL** foram analisados por espectroscopia no infravermelho e seus espectros encontram-se ilustrados na Figura 28. O espectro completo de **HL** encontra-se em Anexo (Figura 50).

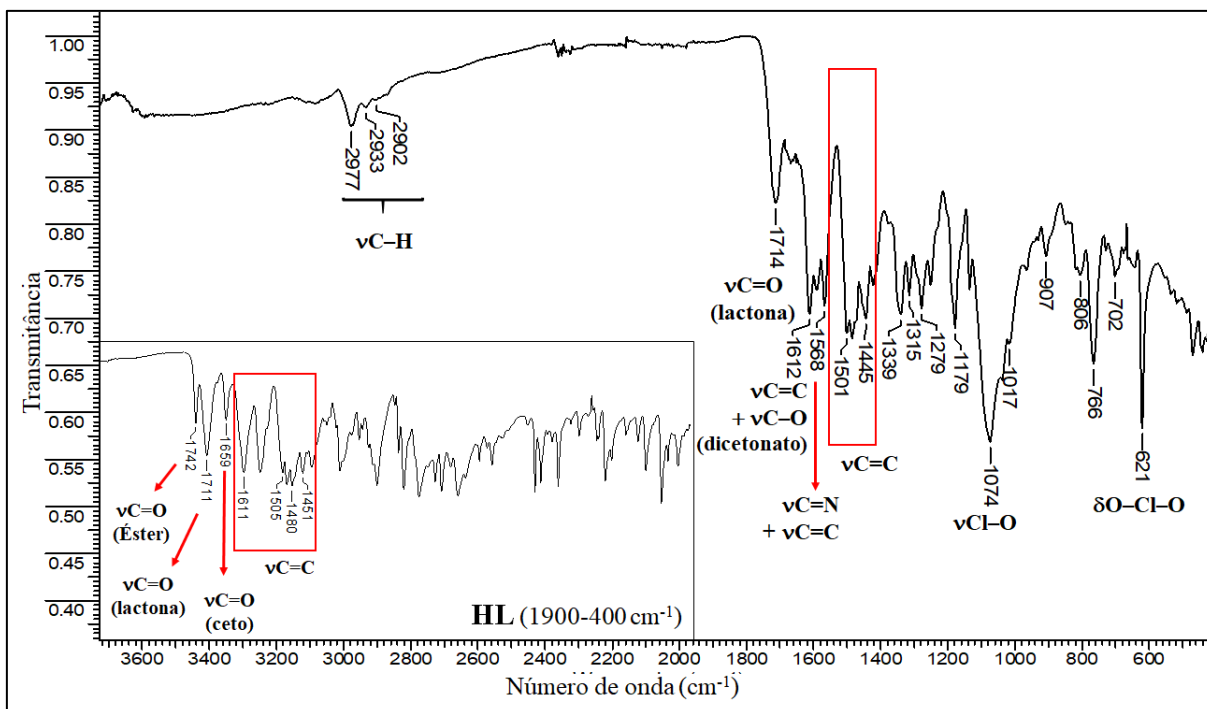


Figura 28: Espectro de infravermelho do complexo **1b-Co^{II}** exibido na faixa de 3700-400 cm^{-1} e do ligante **HL** inserido na faixa de 1900-400 cm^{-1} com destaque para as principais bandas.

O espectro de **HL** exibe as principais bandas que sofreram modificações após a complexação. O ligante livre apresenta três bandas em 1742 cm^{-1} , 1711 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} referentes aos estiramentos C12=O4 (éster alifático), C2=O2 (lactona) e C10=O3 da porção ceto do grupo β -cetoéster, respectivamente [12, 119, 120]. Resultados obtidos a partir de cálculo DFT mostraram valores vibracionais dos grupos carbonilas de **HL** muito próximos dos dados experimentais. Valores teóricos para os $\nu(\text{C}=\text{O})$ referentes aos grupos C12=O4, C2=O2 e C10=O3 do ligante foram de 1742, 1719 e 1669 cm^{-1} , respectivamente. A Tabela 2 mostra a comparação dos valores de estiramentos obtidos pelo cálculo e os dados experimentais.

Tabela 2: Atribuições das principais bandas do espectro de infravermelho obtido para **HL** e **1b-Co^{II}** e dos cálculos TD-DFT.

Atribuições	HL exp.	HL TD-DFT	1b-Co ^{II} exp.	1b-Co ^{II} TD-DFT ^a
vC12=O4 (éster)	1742	1742	-	-
vC2=O2 (lactona)	1711	1719	1714	1711
vC10=O3 (grupo ceto)	1659	1669	-	-
vC=C	1611, 1505, 1408, 1451	1599	1501, 1485, 1445	1597 (cumarina)
vC–O + vC=C (β-dicetonato)	-	-	1612	1618
vC=C + vC=N	-	-	1591, 1568	1593, 1591, 1570 (TPA)
vCl–O	-	-	1074	-
δOCIO	-	-	621	-

^a Valores referentes às vibrações do cátion **1b-Co^{II}**.

Após a complexação, observou-se o desaparecimento das bandas em 1742 cm⁻¹ e 1659 cm⁻¹ no espectro de **1b-Co^{II}** (Figura 28), confirmando a desprotonação do ligante, que assume a forma [O=C–C=C–O⁻] (β-dicetonato) e apresenta vibrações em menores frequências no IV do complexo [114]. A abstração de um próton alfa às carbonilas diminui o caráter de ligação dupla entre C–O, como observado na estrutura cristalina (ver sessão 4.1.1.1.), e uma banda intensa em 1612 cm⁻¹ foi observada no espectro do complexo, sendo associada às vibrações mútuas de vC–O + vC=C de **L¹⁻** coordenado. Essa atribuição foi confirmada por cálculos DFT, que mostraram a vibração das ligações C–O e C=C da porção β-dicetonato em 1618 cm⁻¹.

A banda referente ao v(C=O) da lactona não sofreu deslocamento no espectro do complexo, aparecendo em 1714 cm⁻¹ e confirmando que a coordenação não ocorre através desse grupo. Este valor está em conformidade com o resultado de DFT, que mostra esta absorção em 1711 cm⁻¹.

O espectro do complexo apresentou bandas em 1591 e 1568 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos C=C de aromático e C=N característicos dos grupos piridina do TPA [47, 102,113]. Os cálculos mostraram valores bastante similares em 1593, 1591 e 1570 cm^{-1} para esses estiramentos centrados na amina.

No espectro do ligante livre a banda em 1611 cm^{-1} e as bandas na faixa de 1505–1451 cm^{-1} foram atribuídas aos $\nu\text{C}=\text{C}$ da cumarina. No complexo esses estiramentos foram exibidos na faixa 1501-1445 cm^{-1} , sendo associados tanto às ligações C=C da cumarina quanto do TPA [47].

Bandas em 2977, 2933 e 2902 cm^{-1} são referentes à porção alifática do complexo, características de estiramentos C–H [119]. As bandas em 1074 e 621 cm^{-1} no espectro de **1b-Co^{II}** são referentes ao $\nu\text{Cl-O}$ e $\delta\text{O-Cl-O}$, respectivamente, confirmando a presença do contra-íon ClO_4^- na molécula [10,27,47].

4.1.1.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível

Espectros de UV-Vis do complexo **1b-Co^{II}** e do ligante **HL** foram obtidos em DMF espectroscópico e tampão fosfato (pH 7,4). A Figura 29 mostra a sobreposição das curvas obtidas em DMF e tampão fosfato.

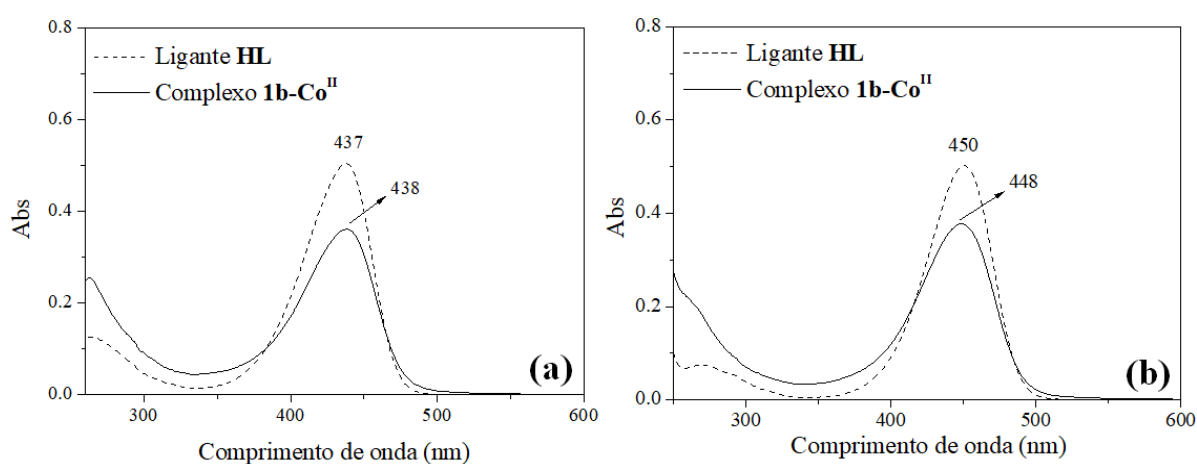


Figura 29: Sobreposição dos espectros de UV-Vis de **1b-Co^{II}** e **HL** a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em (a) DMF e (b) tampão fosfato, pH 7,4.

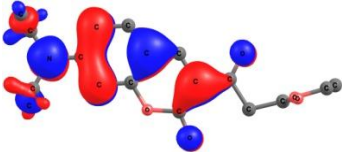
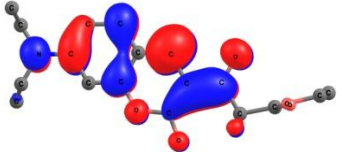
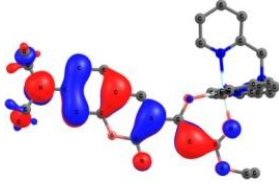
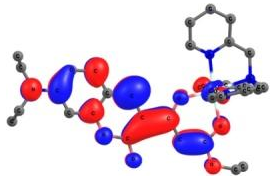
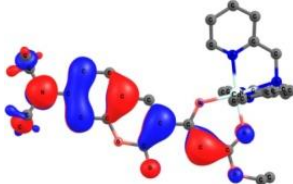
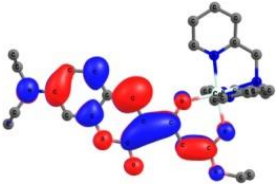
O espectro de **HL** exibe uma banda bastante intensa na região do azul em DMF (437 nm) e em tampão fosfato (450 nm), atribuídas a transições do tipo $\pi-\pi^*$ do anel cumarínico e

da carbonila da porção β -cetoéster. Os valores de absorvidade molar (ϵ) de $51.311 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em DMF e de $46.753 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em tampão mostram que o ligante sofre efeito hipocrômico em solvente mais polar. O deslocamento batocrômico de 13 nm no espectro de **HL** em água confirma a atribuição da banda, visto que transições $\pi-\pi^*$ exibem deslocamentos para maior λ em solventes de maior polaridade [121]. Além disso, derivados de cumarina contendo o grupo dietilamina na posição 7 exibem absorção em 376, 398 e 432 nm, as quais são atribuídas a transições $\pi-\pi^*$ [116,122,123]. Após a complexação, não foi observado deslocamento apreciável desta transição eletrônica, entretanto a absorvidade molar caiu cerca de 15 mil e 9 mil unidades, para 36.232 e $37.930 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em DMF e tampão, respectivamente, para o complexo **1b-Co^{II}**.

Complexos mononucleares de Co^{II} contendo aminas aromáticas e ligantes O,O ou N,O doadores apresentam absorções acima de 350 nm atribuídas à transferência de carga metal-ligante [124,125]. Entretanto, a similaridade entre os espectros de **HL** e **1b-Co^{II}** sugerem que a transição eletrônica permanece centrada no ligante após a complexação. Fazendo uma segunda consideração, uma transferência de carga entre Co^{II} e L^{-1} poderia existir no complexo se sua energia estivesse na mesma faixa em que se encontra a transição $\pi-\pi^*$ no espectro.

Cálculos DFT realizados para **1b-Co^{II}** confirmaram que a banda em 448 nm no espectro em tampão está relacionada com transição $\pi-\pi^*$ centrada no ligante (Tabela 3).

Tabela 3: Energias de excitações verticais de resposta linear selecionada, forças do oscilador calculadas por nível dpq-dOx em PBE0/def2-SVP//PBE0/def2-TZVP/COSMO e valores experimentais de λ e ϵ em tampão fosfato (pH 7,4) e DMF para o complexo **1b-Co^{II}** e o ligante **HL**.

Compostos	λ (nm)	f^a (au)	Componentes de excitação de um elétron ^b				Experimental	
			h^+	e^-	Atribuição ^c	%	λ_{\max} (nm)	
							Tampão	DMF
HL	390	0,944			$\pi-\pi^*$	97	450	437
			HOMO	LUMO			(46.753)	(51.311)
1b-Co^{II}	399	1,086			$\pi-\pi^*$	49	448	438
			HOMO β	LUMO β			(37.930)	(36.232)
					$\pi-\pi^*$	47		
			HOMO α	LUMO α				

^aForça do oscilador. ^bPrincipais contribuições de excitações de um elétron para as transições, representado como partícula-buraco ($h^+ \rightarrow e^-$). ^cAs atribuições foram feitas com base na forma e na orientação espacial dos orbitais.

As energias de excitação vertical calculadas confirmaram a natureza da transição eletrônica, a força do oscilador apresentou valores muito similares entre **HL** e **1b-Co^{II}** (Tabela 3) e um deslocamento batocrômico foi observado para o complexo. A forma dos orbitais mostrados na Tabela 3 indica que a densidade eletrônica se estende da cumarina ao grupo C12–O4 da porção β-dicetonato de **1b-Co^{II}**, que pode ser justificado pela abstração do H⁺ e pela orientação *cis* dos grupos C–O de **L¹⁻**.

As curvas obtidas a partir dos cálculos de DFT são similares às dos espectros obtidos experimentalmente, com diferença no valor do λ_{máx}, e cuja sobreposição pode ser visualizada na Figura 30.

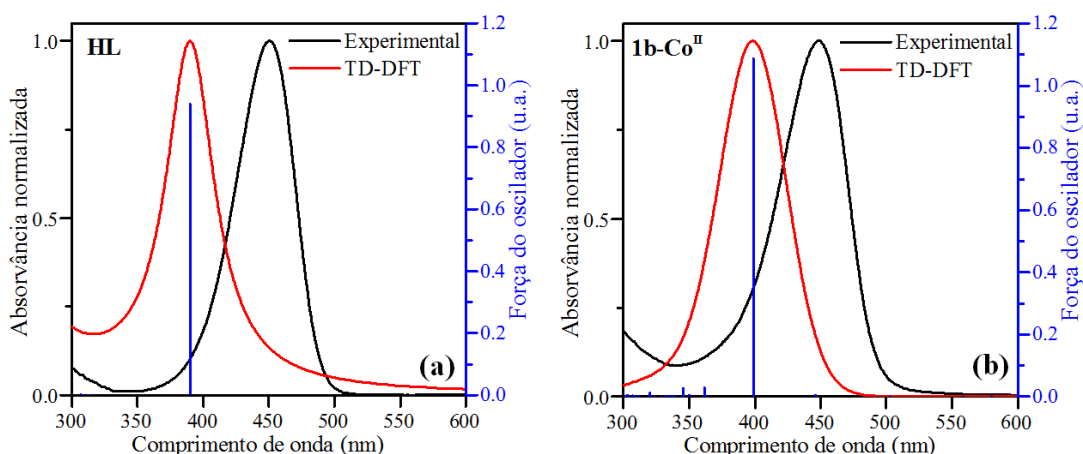


Figura 30: Sobreposição do espectro UV-Vis obtido em tampão fosfato e espectro teórico obtido por TD-DFT em água, para (a) **HL** e (b) **1b-Co^{II}**.

4.1.2. Complexo **2b-Co^{III}**

O complexo **2b-Co^{III}** foi sintetizado em duas etapas de acordo com metodologia adaptada da literatura [111,44], partindo-se do precursor de Co^{III}, [Co^{III}(TPA)Cl₂]ClO₄. Esta metodologia foi empregada uma vez que a reação direta entre o TPA, o Co(ClO₄)₂·6H₂O e o ligante **L¹⁻**, em ambiente aberto produziram o complexo de Co^{II} (**1b-Co^{II}**).

Primeiramente foi realizada a síntese do precursor de Co^{III} [Co^{III}(TPA)Cl₂]ClO₄ como representado na Figura 31.

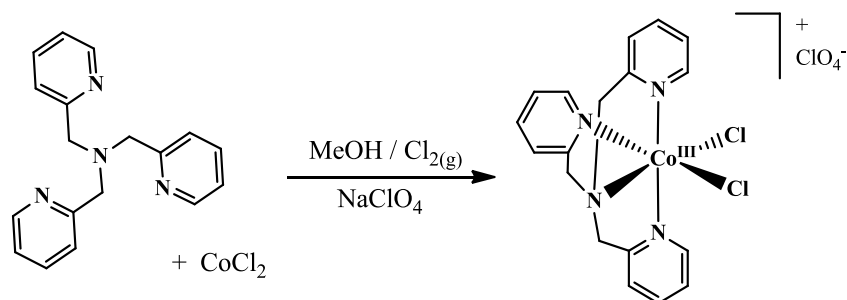


Figura 31: Síntese do precursor de Co^{III} , $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$, realizada em atmosfera de argônio.

O precursor foi sintetizado em um ambiente relativamente seco e sob atmosfera de argônio, com intuito de minimizar ao máximo a presença de oxigênio e/ou água no meio. Resultados não discutidos neste trabalho mostraram que reações envolvendo TPA e cobalto levam facilmente à formação de um dímero do tipo $[(\text{TPA})\text{Co}^{\text{III}}(\mu\text{-O})(\mu\text{-O}_2)\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPA})]^{2+}$ devido à presença de moléculas água e oxigênio do ar. As condições reacionais utilizadas visaram impedir a formação deste dímero.

O TPA e o CoCl_2 anidro, quando reagidos, promovem a formação do intermediário de Co^{II} e a adição de gás cloro no meio reacional foi feita para promover a oxidação à Co^{III} e gerar ligantes Cl^- no meio. A adição de NaClO_4 ao final da reação foi realizada para facilitar a precipitação ou cristalização do produto.

A segunda etapa da síntese consistiu na coordenação de L^{1-} ao precursor $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$ (Figura 32).

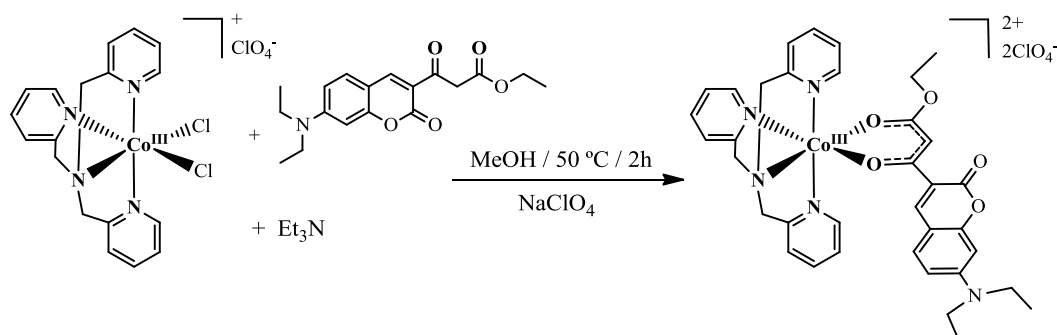


Figura 32: Esquema da segunda etapa de síntese do complexo $2\text{b-Co}^{\text{III}}$.

O sistema foi mantido sob aquecimento para favorecer a reação do precursor $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$, que apresenta baixa solubilidade em metanol, com L^{1-} . Utilizou-se metanol seco para evitar a formação da espécie $[(\text{TPA})\text{Co}^{\text{III}}(\mu\text{-O})(\mu\text{-O}_2)\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPA})]^{2+}$. A

adição de éter sobre a solução marrom ao final da reação foi realizada para promover a precipitação do complexo, que exibiu boa solubilidade em metanol. Contudo, **2b-Co^{III}** apresentou solubilidade parcial na mistura éter/metanol, levando a um baixo rendimento do primeiro sólido isolado (4,5 mg). A coloração marrom do sobrenadante de éter/metanol indicou a presença do complexo dissolvido. Com intuito de obter mais sólido do produto, realizou-se uma segunda purificação após evaporação total destes solventes. Entretanto, esta purificação não foi eficiente, resultando em um sólido (sólido 2) contendo o ligante livre. A evaporação total da mistura de solventes pode ter sido o fator principal para haver ligante no sólido isolado. O sólido 1 isolado foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e o sólido 2 por espectroscopia de RMN de ¹H e análise elementar de CHN.

A metodologia de síntese foi eficiente para formação do complexo de Co^{III}, contudo, a semelhança nas solubilidades de **HL** e de **2b-Co^{III}** dificultaram a purificação do complexo. Pode-se considerar, também, que a reação de formação do complexo **2b-Co^{III}** seja reversível, onde um equilíbrio entre os reagentes e o produto seja estabelecido dentro do tempo reacional estabelecido na síntese, limitando o consumo de **HL**. Ajustes no procedimento de síntese devem ser realizados com intuito de promover o consumo mais eficiente dos reagentes. Em primeira instância, acredita-se que a utilização de excesso do precursor [Co(TPA)Cl₂]ClO₄ favoreça a reação, levando ao consumo máximo de **HL** e sendo facilmente separado do produto final devido a sua baixa solubilidade em metanol. Além disso, modificações externas como o aumento do tempo reacional e da temperatura com refluxo acoplado também podem favorecer a formação do complexo e o rendimento da reação.

4.1.2.1. Espectroscopia de RMN de ¹H

O espectro de RMN de ¹H do complexo **2b-Co^{III}** foi obtido a partir do sólido 2 isolado da síntese. O resultado está mostrado na Figura 33.

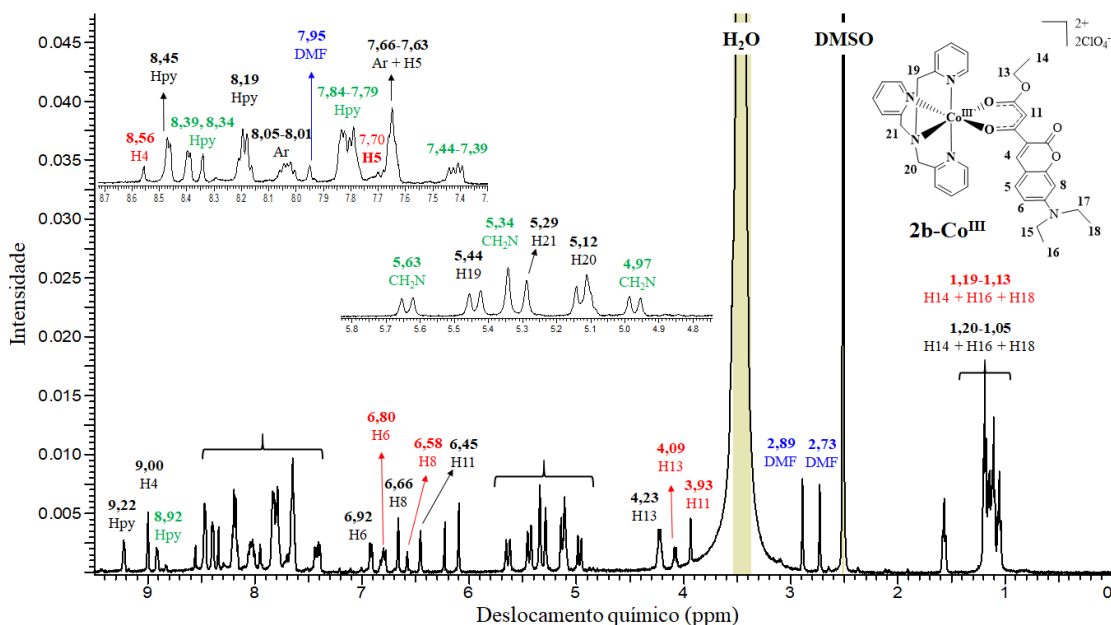


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H obtido em DMSO-d_6 para o complexo $2\text{b-Co}^{\text{III}}$ (amostra do sólido 2) exibido na faixa de 0 a 9,5 ppm. Os deslocamentos químicos indicados em preto são referentes a $2\text{b-Co}^{\text{III}}$, em vermelho a **HL**, em verde ao subproduto $[\text{Co}(\text{TPA})(\text{OH}_2)_2](\text{ClO}_4)_3$ e em azul ao solvente DMF.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais referentes ao complexo $2\text{b-Co}^{\text{III}}$, os quais foram atribuídos com base nos deslocamentos químicos do ligante **HL** livre [12], nos acoplamentos exibidos no espectro bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H} - \text{COSY}$) do complexo, bem como nos parâmetros de multiplicidades dos sinais. Entretanto, foram identificadas outras moléculas presentes na amostra analisada. O espectro foi elucidado de maneira que possibilitou a identificação de todos os compostos presentes no sólido 2.

Os sinais atribuídos ao complexo $2\text{b-Co}^{\text{III}}$, foram associados com base nos deslocamentos referentes aos ligantes coordenados. O sinal em 9,00 ppm foi atribuído ao H4 do núcleo cumarínico, que no espectro do ligante livre aparece em 8,56 ppm. Esse deslocamento é um indicativo da complexação de L^- ao Co^{III} , e normalmente é o hidrogênio da porção cumarina que mais sofre efeito de desproteção pelo metal [109]. O H5 não sofreu mudanças consideráveis após a complexação, exibindo um duplete em 7,69 ppm no espectro de **HL** e um multiplete na faixa de 7,55–7,63 ppm no complexo (incluindo outros hidrogênios aromáticos de $2\text{b-Co}^{\text{III}}$). Já para H6 e H8 foi observado um deslocamento para campo mais baixo após a coordenação, onde os sinais aparecem em 6,82 e 6,59 ppm, respectivamente, no espectro do ligante livre e em 6,92 e 6,66 ppm para $2\text{b-Co}^{\text{III}}$.

Outra evidência da presença de L^{1-} foi o deslocamento do sinal do hidrogênio alfa às carbonilas (H11). No ligante livre, o grupo CH_2 (H11) exibe deslocamento químico em 3,94 ppm e integra para dois átomos de hidrogênio. Já no complexo, este sinal se desloca para 6,45 ppm com integração para 1H. Moléculas do tipo 1,3-dicetona que são reportadas como ligantes em complexos de Co^{III} na sua forma desprotonada apresentam deslocamento acima de 6 ppm para o hidrogênio alfa às carbonilas nos espectros dos respectivos complexos [44].

Os sinais referentes aos $-CH_3$ e $-CH_2$ de L^{1-} também são vistos no espectro de $2b-Co^{III}$, com exceção de H15 e H17, que no ligante livre apresentam sinal em 3,50 ppm. Como não são esperados grandes deslocamentos após a coordenação com cobalto, visto que H15 e H17 estão distantes do sítio de coordenação, acredita-se que estes picos estejam encobertos pelo sinal alargado da água em $\sim 3,50$ ppm. O sinal em 4,23 ppm no espectro do complexo foi atribuído ao hidrogênio H13, o qual apresentou um pequeno deslocamento para campo mais baixo após a complexação (H13 em **HL** é 4,09 ppm). Este deslocamento provocado pela coordenação é facilmente justificado pelo efeito de desproteção que o metal provoca sobre os átomos vizinhos. Um multipletto na faixa de 1,20 a 1,05 ppm foi associado aos hidrogênios das metilas de L^{1-} no complexo (H14, H16 e H18). A integração deste multipletto indicou um número de hidrogênios superior ao esperado para o complexo, sendo associada à presença de ligante livre na amostra de $2b-Co^{III}$.

Sinais referentes ao TPA coordenado também foram observados. Os picos em 9,22, 8,45 e 8,19 ppm foram associados aos hidrogênios dos grupamentos piridina. Essas atribuições foram realizadas com base nos acoplamentos exibidos pelo espectro de COSY do complexo. Além disso, a literatura reporta valores similares para deslocamento de $H_{(py)}$ de TPA coordenado a Co^{III} [44,111]. Dois sinais aparecem como multipletos na faixa de 8,05–8,01 e 7,66–7,63 ppm, e foram associados aos hidrogênios aromáticos do complexo (incluindo H5 da cumarina). Dois dubletos observados em 5,44 e 5,12 ppm, mostrando acoplamento entre si, e um singletto em 5,29 ppm, foram atribuídos aos grupos CH_2 do TPA. Esses deslocamentos são comuns para o TPA coordenado [44,111].

É interessante destacar que não foram observadas duplicações de sinais que indicassem a presença de isômeros *cis* e *trans* do complexo em solução, confirmando a presença de uma única espécie. Contudo, foram encontrados todos os deslocamentos químicos referentes ao ligante livre no espectro, confirmando que uma porção do **HL** não reagiu com cobalto durante a síntese, e que está de acordo com a obtenção de monocristais do ligante no processo de isolamento da reação (sessão 4.1.2.). Além de **HL**, o RMN mostrou sinais em 7,95, 2,89 e

2,73 ppm, que são referentes à molécula de DMF [126]. Apesar da metodologia de síntese não incluir o uso deste solvente, acredita-se que tal contaminação ocorreu durante o processo de secagem do metanol (usado como solvente da síntese) através da peneira molecular utilizada.

O espectro também exibiu outros deslocamentos químicos na região de aromático em 8,92 ppm, nas faixas de 8,39-8,34 ppm, 7,84-7,79 ppm e 7,44-7,39 ppm, que foram associados a $H_{(py)}$ do TPA coordenado na forma de outra espécie diferente de **2b-Co^{III}**. Esta atribuição foi confirmada também pelos sinais referentes aos grupos CH_2 do TPA. Dois doubletos aparecem em 5,63 e 4,97 ppm que acoplam entre si (observação do espectro bidimensional) e um singleto em 5,34 ppm, foram atribuídos aos CH_2 . Acredita-se que um derivado do precursor usado na síntese esteja presente no sólido isolado na forma $[Co^{III}(TPA)X_2]^{3+}$, onde X = solvente.

Dados de análise elementar de CHN confirmaram as espécies atribuídas no RMN do sólido 2 e indicaram que a quarta espécie presente na amostra corresponde a um complexo do tipo $[Co^{III}(TPA)(OH_2)_2](ClO_4)_3$ (dados mostrados na sessão experimental 3.2.2.).

4.1.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro na região de infravermelho do complexo **2b-Co^{III}** foi realizado a partir da amostra do sólido 1 (primeiro sólido isolado da síntese do complexo). A Figura 34 exibe o gráfico representativo do espectro do complexo e do ligante **HL**.

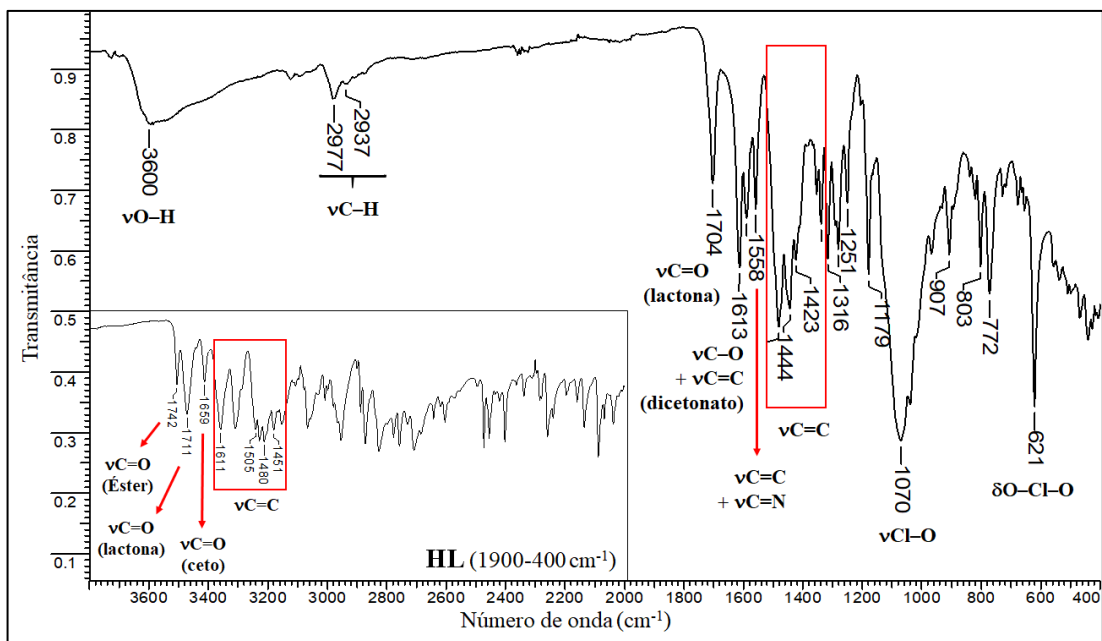


Figura 34: Espectro no infravermelho do complexo **2b-Co^{III}** exibido na faixa de 3800-400 cm^{-1} e do ligante **HL** exibido da faixa de 1900-400 cm^{-1} com destaque para as principais bandas.

Os dados de infravermelho de **2b-Co^{III}** foram bastante similares ao do seu complexo análogo de Co^{II} (**1b-Co^{II}**, sessão 4.1.1.2.). Comparando com o espectro do ligante livre, observou-se que a banda referente ao estiramento do grupo éster do ligante, $\nu\text{C}12=\text{O}4$ em 1742 cm^{-1} , desapareceu após a complexação. Além desse resultado indicar a desprotonação e coordenação do ligante pela porção β -cetoéster, ele sugere que no sólido 1 não há molécula de **HL** livre como observado pela análise de RMN do sólido 2 na sessão anterior. O estiramento de $\text{C}10=\text{O}3$ do ligante em 1659 cm^{-1} também desapareceu confirmando a forma **L¹⁻**.

Uma banda intensa em frequências mais baixas apareceu em 1613 cm^{-1} , sendo relacionada com os estiramentos de $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$ da porção β -dicetonato [2]. Cálculos de DFT mostraram que após a complexação, a molécula apresenta estiramentos mútuos de $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}-\text{O}$ da forma enólica do grupo β -cetoéster ($\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{O}^-$), exibindo valores de 1573 e 1546 cm^{-1} , Tabela 4. O estado de oxidação do metal em **2b-Co^{III}** causa um efeito maior sobre as ligações $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}-\text{C}$ do ligante quando comparado com seu análogo **1b-Co^{II}** e, por isso, os cálculos mostraram estiramentos em menores números de onda para **2b-Co^{III}**.

Devido ao fato da carbonila da lactona não estar envolvida com a complexação, não foi observado deslocamento considerável no estiramento dessa ligação, apresentando valor de 1704 cm^{-1} no espectro do complexo e sendo confirmado pelos cálculos de DFT com estiramento de 1716 cm^{-1} .

O espectro também exibiu bandas em 1590 e 1558 cm^{-1} associadas aos $\nu\text{C}=\text{C}+\nu\text{C}=\text{N}$ da cumarina e das piridinas do TPA [47,102,113]. Essa atribuição foi similar aos resultados de DFT, que apresentaram estiramentos em 1592, 1590 e 1565 cm^{-1} para as ligações aromáticas da amina auxiliar. Um conjunto de bandas na faixa de 1482–1423 cm^{-1} foram atribuídas às ligações C=C das porções aromáticas do complexo.

Bandas referentes aos grupos alifáticos foram atribuídas em 2977 cm^{-1} e 2937 cm^{-1} para $\nu\text{C}-\text{H}$. Foram observados também vibrações que confirmaram a presença do contra-íon ClO_4^- no complexo, que exibiu $\nu\text{Cl}-\text{O}$ em 1070 cm^{-1} e $\delta\text{O}-\text{Cl}-\text{O}$ em 621 cm^{-1} [10,27,47]. Além disso, uma banda larga em 3600 cm^{-1} foi associada $\nu\text{O}-\text{H}$ de água que pode estar presente na rede do complexo, pois a molécula de **2b-Co^{III}** não grupos O-H.

Tabela 4: Atribuições das principais bandas do espectro de infravermelho experimental e calculado por TD-DFT do ligante **HL** e complexo **2b-Co^{III}**.

Atribuições	HL exp.	HL TD-DFT	2b-Co ^{III} exp.	2b-Co ^{III} TD-DFT ^a
$\nu\text{O}-\text{H}$	-	-	3600	-
$\nu\text{C}12=\text{O}4$ (éster)	1742	1742	-	-
$\nu\text{C}2=\text{O}2$ (lactona)	1711	1719	1704	1716
$\nu\text{C}10=\text{O}3$ (grupo ceto)	1659	1669	-	-
$\nu\text{C}=\text{C}$	1611, 1505, 1408, 1451	1599	1482, 1444, 1423	1546 (cumarina)
$\nu\text{C}-\text{O} + \text{C}=\text{C}$ (β -dicetonato)	-	-	1613 ^b	1573, 1546
$\text{C}=\text{C} + \nu\text{C}=\text{N}$	-	-	1590, 1558	1592, 1590, 1565 (TPA)
$\nu\text{Cl}-\text{O}$	-	-	1070	-
δOCIO	-	-	621	-

^a Valores referentes às vibrações do cátion **2b-Co^{III}**.

^b Valor atribuído segundo reportado na literatura [114]

4.1.3. Complexo 2c-Co^{III}

A metodologia de síntese seguida para obtenção do complexo **2c-Co^{III}** foi similar à do complexo **1b-Co^{II}** discutida no item 4.1.1 (Figura 35).

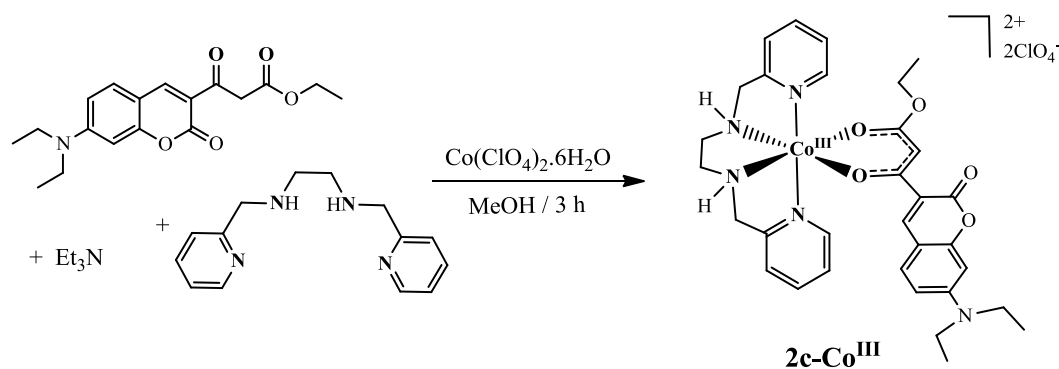


Figura 35: Esquema de síntese para o complexo **2c-Co^{III}**.

O complexo foi sintetizado primeiramente pela aluna de iniciação científica Jéssica Assunção e posteriormente reproduzida para continuidade dos estudos sobre a molécula. Assim como para **1b-Co^{II}**, a ordem de adição dos reagentes foi selecionada de maneira a formar uma espécie intermediária do tipo $[\text{Co}(\text{Py}_2\text{en})(\text{S})_2]^{3+}$, a qual teria a substituição das moléculas de solvente (S) pelo ligante desprotonado, L^{1-} .

Diferentemente do complexo **1b-Co^{II}**, o sistema reacional aberto foi suficiente para levar à oxidação do metal. O valor de condutividade molar igual a $131,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ confirmou a formação de um complexo de Co^{III} , indicando a presença de um eletrólito do tipo 1:2 [110] em solução, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{L})(\text{Py}_2\text{en})]^{2+} \cdot 2\text{ClO}_4^-$. Além disso, a análise elementar de CHN está em acordo com a estrutura proposta, confirmando a formação de um complexo catiônico de Co^{III} contendo dois contra-íons perclorato e indicando que a estrutura química de **2c-Co^{III}** apresentada em solução é a mesma do estado sólido.

A diferença eletrônica entre os ligantes TPA e Py_2en pode justificar a formação de complexos com diferentes estados de oxidação para **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}**. A maior capacidade aceptora π dos grupos piridinas do TPA pode favorecer a obtenção do centro metálico de Co^{II} , menos oxidado. Por outro lado, o Py_2en , que possui dois grupos aminas, é um ligante com maior caráter doador σ , estabilizando o estado de oxidação +3 do cobalto.

Diversas tentativas para obtenção de monocristais para determinação da estrutura de **2c-Co^{III}** por DRX foram realizadas, no entanto, o complexo apenas precipitava na forma de sólido amorfo ou na forma de microcristais inadequados para serem medidos.

4.1.3.1. Espectroscopia de RMN de ^1H

Espectros de RMN de ^1H foram obtidos em DMSO-d_6 para o ligante **HL** e o complexo **2c-Co^{III}** (Figura 36). A análise bidimensional do complexo (^1H X ^1H – COSY) encontra-se na Figura 37.

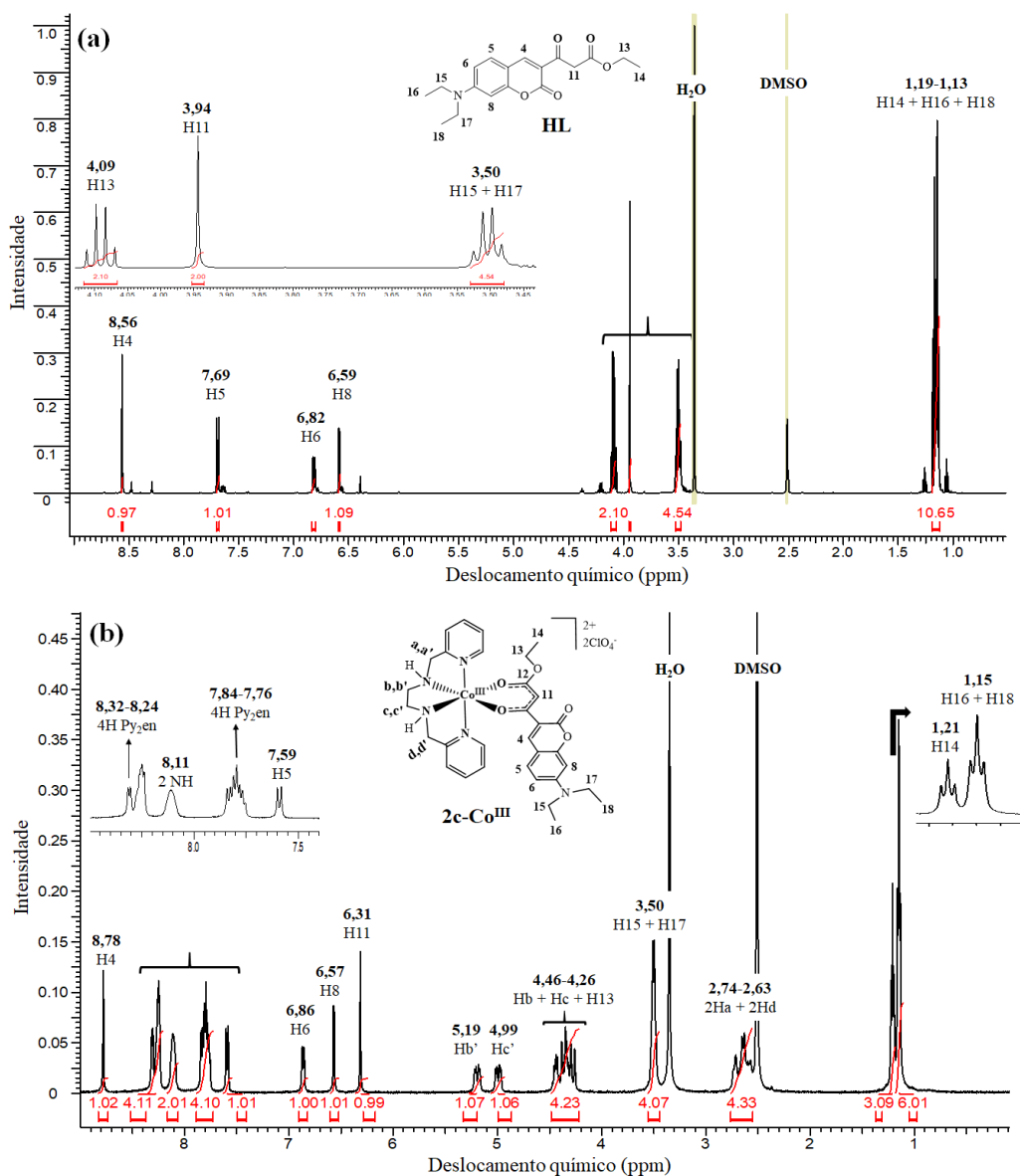


Figura 36: Espectros de RMN de ^1H do ligante **HL** (a) e do complexo **2c-Co^{III}** (b) em DMSO-d_6 , de 9 a 0 ppm. As indicações a-d, a'-d' para CH_2 do Py_2en indicam orientações diferentes para esses hidrogênios.

O espectro de RMN do ligante **HL** está atribuído na figura segundo os dados reportados na literatura [12] e foram usados como referência para os deslocamentos químicos do **2c-Co^{III}**. O hidrogênio mais desblindado de **HL** foi atribuído ao H4, apresentando sinal em 8,56

ppm e como já mencionado, é um dos átomos mais importantes para indicação da coordenação da cumarina. Após a complexação, esse hidrogênio sofre deslocamento para campo mais baixo, exibindo um singlete em 8,78 ppm. O hidrogênio H5 apresentou um pequeno deslocamento de 0,10 ppm para campo mais alto, aparecendo em 7,59 ppm no complexo. Este hidrogênio apresenta-se como um dubleto, sofrendo acoplamento com H6 ($J = 9,09$ Hz), que exibiu deslocamento similar ao de **HL** livre. H8 também não apresentou deslocamento apreciável, exibindo um singlete em 6,57 ppm. A desprotonação e a coordenação de **HL** foram evidenciadas também pelo deslocamento químico referente ao H11 de 3,94 ppm em **HL**, para 6,31 ppm no complexo. Deslocamentos químicos como este são observados em sistemas similares reportados na literatura [44].

No espectro de **HL**, os grupos CH_2 exibem quarteto em 4,09 ppm para H13 e um multipletto em 3,50 ppm para H15 e H17. Após a complexação, H13 apresentou deslocamento para a faixa de 4,46–4,26 ppm e H15 e H17 permaneceram em 3,50 ppm. O efeito de desproteção que o metal proporciona sobre os hidrogênios próximos ao sítio de coordenação justifica o deslocamento de H13. Porém, H15 e H17 não sofreram deslocamento porque estão muito distantes do sítio de coordenação do ligante. Os grupos metila apresentaram deslocamento químico na mesma região em ambos espectros, exibindo dois tripletos em 1,21 ppm (H14) e 1,15 ppm (H16 e H18) para **2c-Co^{III}**.

Os deslocamentos atribuídos ao Py_2en foram feitos com base nos resultados de COSY e nos dados da literatura. Dois multipletos na região de aromático foram atribuídos aos quatro átomos de hidrogênio de cada grupo piridina, com deslocamentos na faixa de 8,32–8,24 ppm e 7,84–7,76 ppm. Moléculas com grupos piridínicos coordenados a Co^{III} apresentam deslocamento químico para os hidrogênios aromáticos entre 7 e 9 ppm [44,127]. Um singlete largo integrando para dois hidrogênios foi observado em 8,11 ppm, sendo atribuído aos dois grupos NH do Py_2en . Este sinal apresentou acoplamento com os grupos CH_2 vizinhos da amina ($\text{CH}_2(\text{a})$; $\text{CH}_2(\text{b})$; $\text{CH}_2(\text{c})$; $\text{CH}_2(\text{d})$) e pode ser visualizado no espectro COSY (Figura 37).

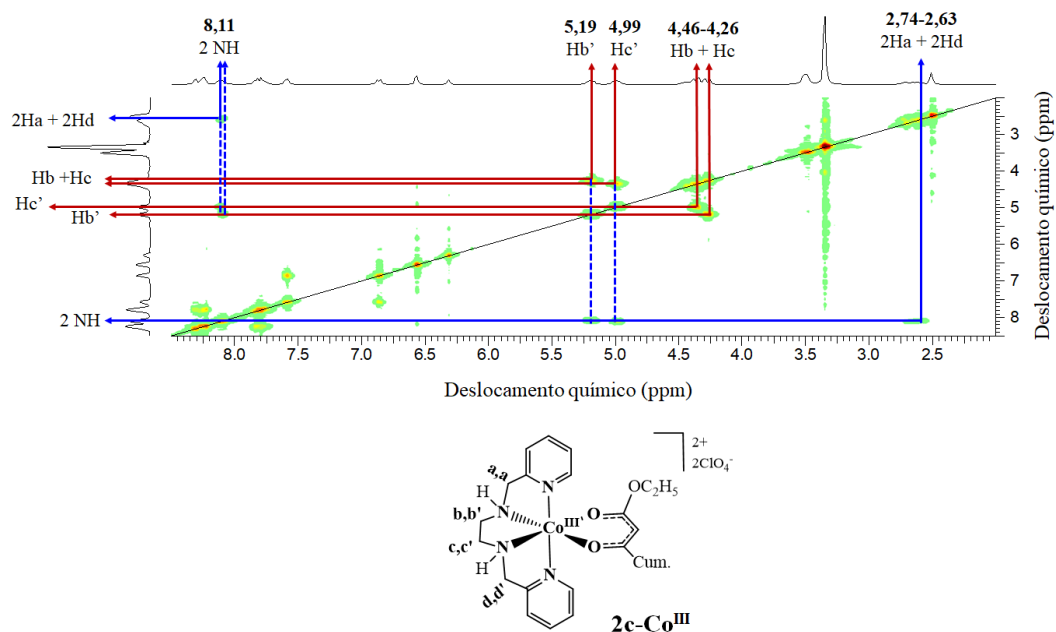


Figura 37: Espectro bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) do complexo $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ em DMSO-d_6 , de 2,0 a 8,5 ppm, contendo a representação simplificada da estrutura de $2\text{c-Co}^{\text{III}}$.

O acoplamento entre os grupos CH_2 e o NH estão indicados pelas setas em azul na figura acima. Os sinais observados na faixa 2,74–2,73 ppm foram atribuídos aos grupos $\text{CH}_2(\text{a},\text{a}')$ e $\text{CH}_2(\text{d},\text{d}')$ da Py_2en , por apresentarem acoplamento apenas com os grupos NH no COSY. Por outro lado, os sinais em 5,19 ppm (para Hb') e 4,99 ppm (para Hc') sofrem acoplamento tanto com NH quanto com os hidrogênios Hb e Hc , na faixa de 4,46–4,26 ppm (indicado pelas setas em vermelho na Figura 37). A orientação espacial dos hidrogênios de cada um desses grupos influenciou consideravelmente no deslocamento químico. Desta forma, Hb e Hb' não apresentaram o mesmo sinal no espectro de RMN, assim como Hc e Hc' . Além disso, apenas um hidrogênio de cada grupo (Hb' e Hc') acopla com NH da amina, corroborando para existência de dois ambientes diferentes para cada hidrogênio dos CH_2 . Dois valores de constantes de acoplamento J foram observadas para Hb' e Hc' : 11,22 Hz, associada ao acoplamento mais fraco $J_{\text{b}'/\text{NH}}$ e $J_{\text{c}'/\text{NH}}$ e 24,02 Hz, podendo ser associado ao acoplamento geminal $J_{\text{b}/\text{b}'}$ e $J_{\text{c}/\text{c}'}$ ou vicinal $J_{\text{b}/\text{c}}$ e $J_{\text{b}'/\text{c}'}$ [128]. Esse arranjo, que mantém os grupos CH_2 do Py_2en mais rígidos devido à coordenação ao metal, foi confirmado por espectroscopia de RMN de ^{13}C uni e bi-dimensionais (DEPT-Q e HSQC), onde foi possível verificar a correlação entre os deslocamentos dos átomos de hidrogênio e carbono.

O espectro de ^{13}C (Anexo, Figura 54) apresentou todos os sinais referentes à estrutura de $2\text{c-Co}^{\text{III}}$, estando em acordo com as atribuições de RMN de ^1H . Os deslocamentos em

60,15 e 59,67 ppm foram associados aos átomos Cb e Cc do Py₂en, respectivamente. No espectro de HSQC (Figura 55, Anexo) foi possível observar que o sinal de Cb apresenta acoplamento com os dois átomos de hidrogênio Hb e Hb' (4,46-4,26 e 5,19 ppm, respectivamente). Da mesma maneira, o carbono Cc exibiu correlação com Hc (de δ 4,46-4,26) e Hc' (de δ em 4,99). Esse resultado confirmou que a orientação espacial dos hidrogênios dos grupos CH_{2(b,b')} e CH_{2(c,c')} refletiu consideravelmente nos deslocamentos químicos no espectro de hidrogênio do complexo **2c-Co^{III}**.

De modo geral, a presença dos deslocamentos químicos da amina auxiliar comprovou a formação do complexo [Co(L)Py₂en]²⁺, **2c-Co^{III}**. Além disso, a ressonância acentuada observada no espectro confirma um sistema diamagnético, indicando que o cobalto assume uma configuração d⁶, baixo spin, diferente do que foi obtido para o complexo derivado do TPA, [Co(L)TPA]⁺, **1b-Co^{II}**.

4.1.3.2. Espectroscopia na região do infravermelho

O complexo **2c-Co^{III}** foi analisado por espectroscopia no IV e comparado com **HL** (Figura 38).

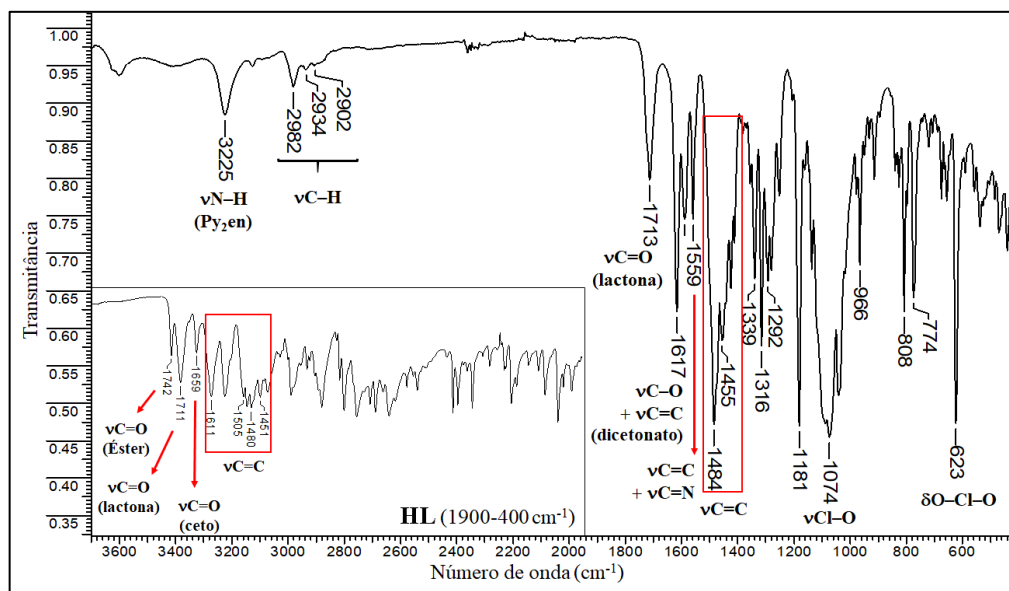


Figura 38: Espectro no infravermelho do complexo **2c-Co^{III}** exibido na faixa de 3700-400 cm⁻¹ e do ligante **HL** exibido da faixa de 1900-400 cm⁻¹ com destaque para as principais bandas.

Como já discutido no item 4.1.1.2., o espectro de **HL** livre apresenta bandas em 1742 cm^{-1} , 1711 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} referentes aos estiramentos C=O do éster alifático, da lactona e do grupo ceto (referente a porção β -cetoéster), respectivamente [12,119,120]. Após a complexação observou-se o desaparecimento das bandas em 1742 e 1659 cm^{-1} no espectro de **2c-Co^{III}**, confirmando a formação da espécie **L¹⁻** do ligante. A análise vibracional através de cálculos DFT foi realizada para as estruturas de **2c-Co^{III}** e **HL**, e os resultados estão em acordo com as atribuições do espectro experimental. A Tabela 5 resume os dados experimentais e teóricos obtidos.

Tabela 5: Atribuições das principais bandas do espectro de infravermelho experimental e calculado por TD-DFT do ligante **HL** e complexo **2c-Co^{III}**.

Atribuições	HL exp.	HL TD-DFT	2c-Co^{III} exp.	2c-Co^{III} TD-DFT^a
vN-H (amina)	-	-	3225	-
vC12=O4 (éster)	1742	1742	-	-
vC2=O2 (lactona)	1711	1719	1713	1715
vC10=O3 (grupo ceto)	1659	1669	-	-
vC=C	1611, 1505, 1408, 1451	1599	1484 ^b , 1459 ^b , 1424 ^b	1600 (cumarina)
vC-O + vC=C (β -dicetonato)	-	-	1617 ^c , 1590, 1559	1572, 1543
vC=C + vC=N	-	-	1590, 1559	1603, 1570 (Py ₂ en)
vCl-O	-	-	1074	-
δ OCIO	-	-	623	-

^a Valores referentes às vibrações do cátion **2c-Co^{III}**.

^b Atribuição baseada em dados da literatura [127,129].

^c Atribuição baseada em dados da literatura [2].

Segundo os cálculos, após a coordenação, duas novas frequências aparecem em 1572 e 1543 cm^{-1} referentes à porção β -dicetonato coordenada (vC-O + vC=C) (Tabela 5). No espectro de IV, foram observadas bandas em 1590 e 1559 cm^{-1} que podem estar associadas a

estes estiramentos. Estas absorções também podem ter contribuição das ligações C=C e C=N do py₂en conforme sugerido pelos cálculos e pelos dados da literatura [47,102,112].

Apesar dos cálculos não apontarem, a banda intensa em 1617 cm⁻¹ observada no espectro também foi associada às ligações C–O e νC=C do dicetonato, estando de acordo com espectros de IV de complexos de Co^{III} contendo ligantes com mesmo sítio de coordenação já reportados [2]. Um conjunto de bandas em 1484–1424 cm⁻¹ foi associado às ligações C=C de aromático referentes à amina [127] e ao núcleo cumarínico [129], conforme indica dados da literatura. A presença da amina auxiliar foi confirmada também pela banda em 3225 cm⁻¹ associada ao νN–H da amina secundária [119]. Estiramentos de ligação C–H estão presentes no espectro de **2c-Co^{III}** na faixa de 2982-2902 cm⁻¹ [119]. As bandas em 1074 e 623 cm⁻¹ presentes no espectro do complexo estão associadas ao νCl–O e δO–Cl–O, respectivamente, confirmando a presença do contra-íon ClO₄⁻ na molécula [10,27,47].

4.1.3.3. Espectroscopia no Ultravioleta-visível

Os espectros do complexo **2c-Co^{III}** e do ligante **HL** foram obtidos em DMF espectroscópico e em tampão fosfato (pH 7,4). A Figura 39 mostra a sobreposição das curvas nos dois solventes.

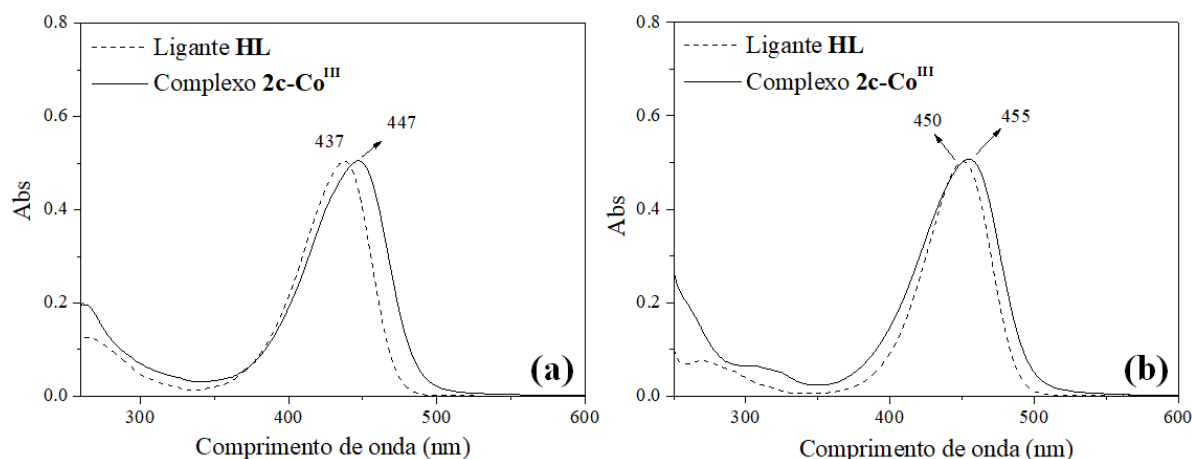


Figura 39: Sobreposição dos espectros no ultravioleta-visível de **2c-Co^{III}** e **HL** a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em: (a) DMF e (b) tampão fosfato, pH 7,4.

Os espectros eletrônicos do complexo **2c-Co^{III}** são bastante similares aos do ligante livre **HL** em ambos os solventes, apresentando uma banda intensa em 447 nm em DMF e em 455 nm em tampão, atribuída à transição $\pi-\pi^*$ centrada no ligante, assim como para o

complexo **1b-Co^{II}** (sessão 4.1.1.3.). Para **2c-Co^{III}**, foi observado um efeito hipercrômico em DMF, cujo ϵ calculado foi de $51.997 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e de $48.912 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em tampão (Tabela 6). Esses valores foram ligeiramente maiores que os ϵ determinados para o ligante livre ($\epsilon = 51.311 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em DMF e $46.753 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em tampão, respectivamente) (Tabela 6).

Cálculos DFT foram realizados para **2c-Co^{III}** e os resultados das transições estão listadas na Tabela 6 em comparação com os dados experimentais. A geometria do complexo foi otimizada sem o contra íon perclorato e considerando-se a conformação de complexos de **Co^{III}** contendo **Py₂en** já reportados [49,102], como representado na Figura 40.

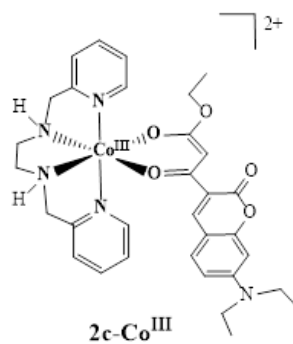

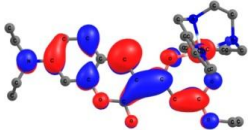
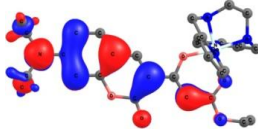
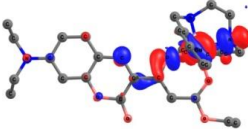
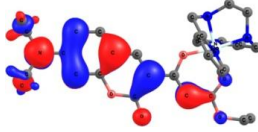



Figura 40: Representação da estrutura geométrica considerada para otimização da geometria de **2c-Co^{III}**.

Tabela 6: Energias de excitações verticais de resposta linear selecionada, forças do oscilador calculadas por nível dpq-dOx em PBE0/def2-SVP//PBE0/def2-TZVP/COSMO para o ligante **HL** e o complexo **2c-Co^{III}**.

Compostos	λ (nm)	f^a (au)	Componentes de excitação de um elétron ^b		Atribuição ^c	%	Experimental	
			h^+	e^-			λ_{\max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
							Tampão	DMF
	415	0,575			$\pi-\pi^*$	62		
			HOMO	LUMO				
2c-Co^{III}	408	0,531			TCLM	46	455 (48.912)	447 (51.997)
			HOMO	LUMO+2				
	422	0,103			TCLM	42		
			HOMO	LUMO+1				

^aForça do oscilador. ^bPrincipais contribuições de excitações de um elétron para as transições, representado como partícula-buraco ($h^+ \rightarrow e^-$). ^c As atribuições foram feitas com base na forma e na orientação espacial dos orbitais.

Os resultados dos cálculos confirmaram a presença de transição $\pi-\pi^*$ para $2\mathbf{c}\text{-Co}^{\text{III}}$ centrada no ligante cumarínico em 415 nm (dado calculado). Os cálculos também mostraram que o complexo apresenta transições referentes à transferência de carga ligante–metal (TCLM) do sistema π do ligante para os orbitais d do Co^{III} em λ de 408 e 422 nm. A curva que representa o espectro teórico mostra que as transições $\pi-\pi^*$ e TCLM de $2\mathbf{c}\text{-Co}^{\text{III}}$ aparecem como uma única banda. A Figura 41 mostra a sobreposição entre os espectros de UV-Vis calculado por DFT e o espectro obtido em tampão fosfato, pH 7,4, para o complexo.

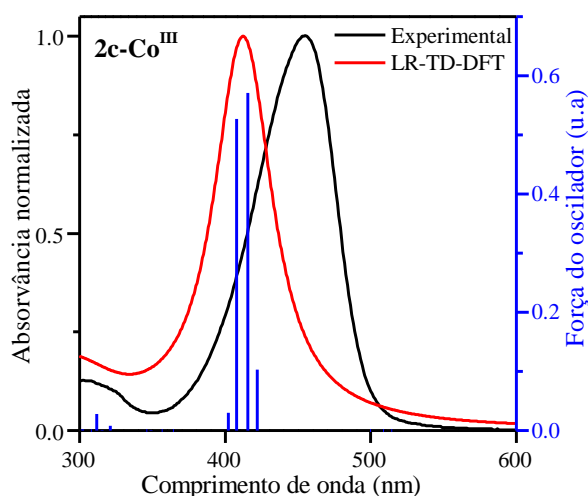


Figura 41: Sobreposição do espectro experimental no UV-Vis obtidos em tampão fosfato e espectro teórico obtido por TD-DFT em água, para o complexo $2\mathbf{c}\text{-Co}^{\text{III}}$.

Esses resultados sugerem que a transição em 455 nm observada no espectro em tampão fosfato pode englobar um conjunto de transições do tipo $\pi-\pi^*$ e TCLM sobrepostas na mesma faixa de energia, como observado no espectro teórico. A TCLM é comum em complexos de Co^{III} hexacoordenados, visto que o metal se encontra no seu estado de oxidação mais alto, estando mais suscetível a receber elétrons do ligante quando comparado com a forma Co^{II} .

Bustamante e colaboradores estudaram complexos mononucleares de Co^{III} contendo uma amina Py_2en e um ligante derivado de naftoquinona O,O doador [49]. Os autores observaram um conjunto de bandas na faixa de 320 a 520 nm em MeCN, as quais foram atribuídas à sobreposição de TCLM dos orbitais π do fenolato para os orbitais $d\sigma$ do cobalto com transições centradas no ligante. Resultados similares foram obtidos por Souza e colaboradores, onde três complexos de Co^{III} coordenados por um ligante bidentado derivado de triazol, N,O doador, exibiram bandas em 364, 355 e 375 nm atribuídas a transferência de

carga do sistema π do ligante para o orbital d_{z^2} do Co^{III} , em MeCN. Nesse trabalho, os complexos estudados diferiam no ligante auxiliar, que correspondem a aminas como TPA, Py_2en e Py_2enMe [102]. Em ambos os trabalhos, os autores usaram cálculos DFT para suportar as atribuições de UV-Vis.

Outras estruturas contendo ligante polinitrogenados similares ao de $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ apresentam bandas de transferência de carga ligante-metal acima de 400 nm em metanol. Esses complexos contém derivados tridentados com porções piridina e imidazol, [(2-hidroxi-benzil)(2-(imidazol-2-il)etil)]amina e [(2-hidroxi-benzil)(2-(piridil-2-il)etil)]amina, e a transição foi tipicamente referenciada ao $\pi\pi^*$ do fenolato para $d\sigma^*$ do Co^{III} [109].

As curvas que representam os espectros de absorção teóricos do ligante e do complexo estão de acordo com os dados experimentais de UV-Vis. Os valores de absorvidade molar determinados em tampão foram correlacionados com a força do oscilador referente a transição $\pi-\pi^*$ (415 nm) e não à TCLM (408 e 422 nm) exibidas pelo cálculo DFT, pois foi a transição com maior percentual de contribuição (62%).

4.2. Estudos de voltametria cíclica

Os processos eletroquímicos do ligante **HL** e dos complexos 1b-Co^{II} , $2\text{b-Co}^{\text{III}}$ e $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ foram investigados por voltametria cíclica (VC) em DMF e seus voltamogramas estão representados nas Figuras 42 e 43, respectivamente. A Tabela 7 mostra os valores dos processos redox vs Fc/Fc^+ e EPH para os compostos.

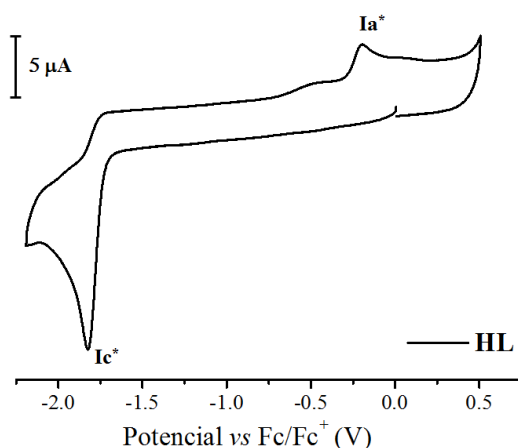


Figura 42: Voltamograma cíclico do ligante livre **HL**, medido em DMF seco a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a $0,100 \text{ V s}^{-1}$, usando eletrodo de carbono vítreo (ET); Ag/AgCl (ER); Fio de Pt (EA) e ferroceno como referência interna, exibido na faixa de -2,25 a 0,75 V.

No voltamograma do ligante foi observado um processo anódico irreversível (I_a^*) em $-0,196 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ (equivalente a $+0,196 \text{ V vs Ag/AgCl}$). Estudos eletroquímicos reportados para derivados híbridos de aminocumarina e naftoquinona em MeCN mostraram uma onda anódica irreversível em torno de $+0,80 \text{ V vs Fc/Fc}^+$, sendo associada ao núcleo aminocumarina da molécula [130]. Em outro trabalho, um derivado contendo duas porções simétricas de 7-dietilaminocumarina e oxadiazol ligadas por silício apresentou uma onda de oxidação positiva irreversível em $+0,86 \text{ V vs Ag/AgCl}$, em DMF, a qual foi relacionada à remoção de elétrons dos grupos cumarínicos terminais [131]. Para o nosso caso, o processo anódico observado no VC de **HL** pode estar associada também à oxidação da porção cumarina.

O ligante **HL** também exibiu uma onda catódica irreversível (I_c^*) em $-1,82 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ (equivalente a $-1,43 \text{ V vs Ag/AgCl}$), atribuída à redução da carbonila. A estrutura química de **HL** apresenta três grupos carbonílicos: um referente à lactona do núcleo cumarínico e dois referentes à porção β -cetoéster. Desta forma, a redução observada no voltamograma de **HL** pode estar associada ao ganho de elétrons de quaisquer desses grupos contendo a ligação $\text{C}=\text{O}$. Na ausência de um estudo mais detalhado sobre o comportamento eletroquímico de **HL**, torna-se complicado fazer atribuições precisas e propor mecanismos sobre os processos redox observados. Contudo, a literatura apresenta estudos associados à voltametria cíclica de compostos que podem ser diretamente comparados com o nosso ligante.

Estudos eletroquímicos realizados com cumarina simples (1,2-benzopirona) em pH 8,0 mostraram um processo catódico em $-1,65 \text{ V vs Ag/AgCl}$, atribuído à redução da carbonila da lactona [132]. Os autores associaram este processo à formação de um grupo hidroxila, por um mecanismo que envolve o ganho de dois elétrons e dois prótons. Em outro trabalho, Nuñez-Vergara e colaboradores estudaram alguns derivados condensados de piridina-cumarina em DMF, os quais apresentaram dois processos catódicos na faixa de $-1,60$ a $-2,05 \text{ V}$ e $-2,03$ a $-2,54 \text{ V}$ (*vs Ag/AgCl*). Os estudos indicaram que os dois processos de redução estavam associados à carbonila da lactona, onde a primeira onda catódica correspondia ao ganho de um elétron para formação de um ânion radical intermediário $[\text{C}-\text{O}]^{\bullet-}$, e a segunda onda foi atribuída à formação de um grupo hidroxila a partir do radical intermediário formado [133].

A presença de um sítio β -dicetona em **HL** torna viável a comparação com moléculas contendo fragmento similar. Dez derivados de 1,3-dicetonas contendo substituintes aromáticos e/ou alifáticos foram estudados por Kuhn e colaboradores, onde avaliaram a redução dos compostos através de ensaios eletroquímicos em MeCN e cálculos DFT [134]. O

processo catódico exibido por cada derivado apresentou valores na faixa de $-1,04$ V a $-2,14$ V *vs* Fc/Fc⁺, sendo atribuído à redução de um elétron da carbonila do grupo ceto para formação de um ânion radical. Os autores observaram que a presença de dois substituintes aromáticos ligados à β -dicetona tornaram a redução reversível ou quase-reversível em altas velocidades de varredura, sugerindo a estabilização do ânion radical pelo sistema π -conjugado. Já os derivados contendo pelo menos um grupo alifático ligado ao carbono da carbonila (posições 1 ou 3) apresentaram redução irreversível.

Outra classe de compostos β -dicetonados que apresentam estudos eletroquímicos reportados na literatura são as curcuminas. Stanic e colaboradores observaram três processos de redução bem definidos em $-1,1$, $-1,3$ e $-1,6$ V *vs* Ag/AgCl em pH 8,5 para a molécula de curcumina. Os autores atribuíram os processos à redução do grupo ceto [135]. Ahmadi e colaboradores também observaram comportamento similar da curcumina em solução tampão de Tris-HCl, pH 7,2, onde os dois potenciais de redução apresentados foram de $-1,18$ e $-1,21$ V *vs* Ag/AgCl, atribuídos à redução do grupo ceto por um mecanismo que envolve duas etapas [136].

A literatura consultada sugere que o potencial de redução de **HL** ($-1,82$ V *vs* Fc/Fc⁺ e $-1,43$ V *vs* Ag/AgCl) pode estar associado tanto ao grupo lactona da cumarina quanto às carbonilas da porção β -cetoéster. Em ambos os casos, a redução do grupamento carbonila pode levar à formação de um ânion radical, que é mais instável, e/ou à formação do grupo hidroxila.

Foi observado que, após a complexação de **HL** com cobalto, o valor da onda catódica atribuída à carbonila não sofreu modificações consideráveis, aparecendo em torno de $-1,8$ V *vs* Fc/Fc⁺ nos voltamogramas dos complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** (Figura 43). Vale ressaltar que apesar do potencial **Ic^{*}** não ter sofrido deslocamento, a intensidade do processo catódico sofreu uma diminuição considerável nos complexos, quando comparado com **HL** livre.

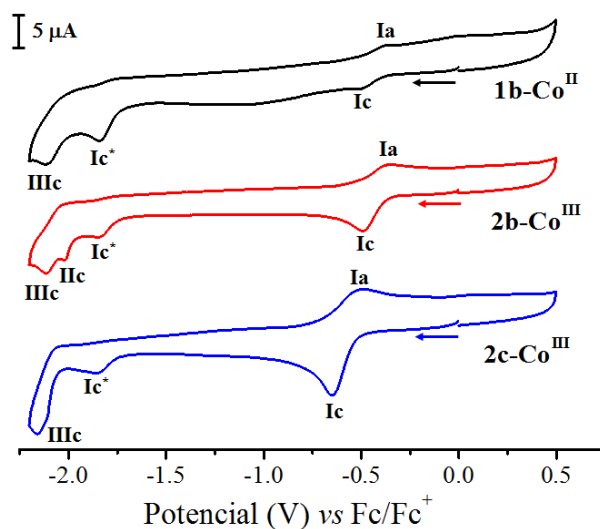


Figura 43: Voltamograma cíclico dos complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}**, medido em DMF seco a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a $0,100 \text{ V s}^{-1}$, usando eletrodo de carbono vítreo (ET); Ag/AgCl (ER); Fio de Pt (EA) e ferroceno como referência interna, exibido na faixa de -2,25 a 0,75 V.

Os complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** também apresentaram processos de redução irreversíveis em torno de $-2,15 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ (IIIc), que podem ser atribuídos às piridinas do TPA e do Py₂en [137]. Complexos pentacoordenados do tipo $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{TPA})\text{X}]^+$, onde $\text{X} = \text{Cl}^-$, Br^- , I^- ou NCS^- apresentam a redução de um elétron localizada sobre o Co^{II} e o TPA, com valores na faixa de $-2,07$ a $-1,93 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ [138]. Sendo assim, as ondas **IIc** e **IIIc** observadas no voltamograma cíclico dos três complexos foi atribuída à redução centrada no grupo piridina das aminas auxiliares. Em **2b-Co^{III}** o processo de redução **IIc**, em $-2,015 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ desaparece com o aumento da velocidade de varredura, se sobrepondo com o processo **IIIc**. Acredita-se que essa nova onda em $-2,015 \text{ V}$ possa estar associada também com a presença da espécie $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPA})(\text{OH}_2)_2](\text{ClO}_4)_3$ na amostra de **2b-Co^{III}**.

Os voltamogramas dos complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** exibiram um par de onda quase-reversível em $E_{1/2} = -0,432 \text{ V}$, $-0,420 \text{ V}$ e $-0,568 \text{ V vs Fc/Fc}^+$, respectivamente, que foram atribuídos ao par redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$. Todos os complexos foram medidos em quatro velocidades diferentes e exibiram aumento proporcional da corrente de pico (I_p), indicando uma boa correlação linear entre $v^{1/2}$ e I_p ($R > 0,9$) (Figuras 51 e 52, Anexo). A reversibilidade do processo foi atribuída segundo os parâmetros de ΔE_p que apresentaram valores de 0,203, 0,136 e 0,155 V para **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}**, respectivamente, e segundo a razão I_{pa}/I_{pc} , que resultaram em valores próximos de 0,9. Esses parâmetros estão resumidos na Tabela 8.

Complexos de Co^{II} com diferentes números de coordenação apresentam potenciais de meia onda reportados tanto para o par $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ [139] quanto para $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ [140]. Shavaleev e colaboradores estudaram uma série de complexos de Co^{II} hexacoordenados contendo ligantes derivados de azol-piridina, os quais exibiram dois processos quase-reversíveis em MeCN. O primeiro par de onda apresentou $E_{1/2}$ na faixa de +0,05 a +0,44 V vs Fc/Fc^+ , sendo associado ao par $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$, já o segundo potencial de meia onda exibiu valores negativos na faixa de -1,57 a -1,08 V vs Fc/Fc^+ , atribuídos ao par $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ [141]. Riga e colaboradores observaram um par redox reversível associado aos seus complexos de Co^{II} contendo ligantes derivados de α -diimina. Os complexos são tetracoordenados, possuem dois ligantes cloreto, e os potenciais de meia onda exibidos foram de -0,269, -0,323 e -0,630 V vs Fc/Fc^+ , sendo associados ao par redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ [142].

Para **1b-Co^{II}**, o processo quase-reversível encontrado, cujo $E_{1/2} = -0,432$ V vs Fc/Fc^+ foi relacionado com o par $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$. Os valores dos potenciais encontrados foram mais próximos aos potenciais reportados na literatura para $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ do que $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$, conforme discutido acima, além de serem similares aos potenciais de complexos de Co^{III} contendo esferas de coordenação semelhantes [44,47,49]. Por exemplo, complexos de Co^{III} contendo ligante TPA e derivados β -dicetonados (como acetilacetona, 1-fenil-butadiona, 1-metil-3-2-(naftil)propano-1,3-diona) e 3-cloro-2,4-pentadiona) exibiram $E_{1/2}$ na faixa de -0,42 a -0,54 V vs Fc/Fc^+ em DMF, para o par $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ [44]. Os autores mostraram, inclusive, que a troca do TPA por uma amina totalmente alifática (TREN – trietilenotetramina) levou à diminuição do potencial de redução e tornou o processo irreversível.

A literatura reporta muitos complexos de Co^{III} com estudos de voltametria cíclica, principalmente quando são explorados para pró-fármacos biorredutíveis. Esses estudos, geralmente, destacam os potenciais redox do centro metálico e a variação desses potenciais de acordo com a estrutura química dos ligantes [42,109]. A influência da natureza da ligação M-L sobre o potencial de redução do metal já está bem estabelecida na literatura [143,144], onde o ligante com maior caráter aceptor π facilita o ganho de elétron pelo metal. O deslocamento da onda catódica observado para os complexos **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** ($I_c = -0,488$ e $-0,646$, vs Fc/Fc^+ , respectivamente), por exemplo, foi associado à diferença das aminas auxiliares ligadas ao cobalto (TPA e Py_2en , respectivamente), onde um potencial de redução mais negativo foi observado para o complexo **2c-Co^{III}**. A presença de um grupo piridina a mais na estrutura do TPA reflete no maior caráter aceptor π deste ligante, quando comparado com Py_2en . Desta forma, o centro metálico de **2b-Co^{III}** torna-se mais pobre em densidade

eletrônica, facilitando o ganho de elétron pelo Co^{III} . Conseqüentemente, o potencial de redução do metal no complexo **2b-Co^{III}** é maior do que no complexo **2c-Co^{III}**, cuja amina auxiliar (py₂en) tem menor caráter aceptor π .

Em termos da elaboração de um pró-fármaco biorredutível, um dos parâmetros avaliados é a faixa do potencial de redução em que a molécula se tornará ativa. Para ativação em hipóxia, a faixa ideal reportada na literatura é geralmente de $-0,4$ a $-0,2$ V vs EPH [9,34] ou, por alguns autores, de $-0,5$ a $-0,1$ V vs EPH [25,35,36]. Complexos contendo ligantes marcadores fluorescentes – derivados de cumarina e antraquinona – foram reportados como modelos de pró-fármacos, apresentando potenciais de redução dentro da faixa ideal, $-0,387$ e $-0,250$ V vs EPH, em DMF [36]. Como o potencial redox de uma espécie depende também do solvente em que ela é estudada, a redução do Co^{III} em um complexo pode ou não estar dentro da faixa em um determinado solvente. Pires e colaboradores, por exemplo, observaram o processo $\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}}$ em $-0,24$ V vs EPH em MeCN, mas em tampão fosfato, pH 7,4, o potencial sofreu um deslocamento catódico para $0,17$ V, acima da faixa ideal [27]. Em uma análise das diferenças entre os solventes, os autores observaram que em solução tampão ocorria a liberação do ligante após a redução do cobalto durante o experimento de VC, tornando o processo $\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}}$ irreversível. Logo, para a modulação do potencial redox do cobalto em um protótipo de pró-fármaco biorredutível, fatores externos à estrutura do complexo também devem ser avaliados cuidadosamente.

Um bom exemplo a ser citado, são os estudos de Yamamoto e colaboradores com dois complexos de Co^{III} contendo híbridos de cumarina-3-carboxilato e cumarina-3-hidroxiato, os quais tiveram seu potencial redox determinados em DMF. O primeiro complexo exibiu processo catódico dentro na faixa para ativação em hipóxia ($-0,432$ V vs EPH), enquanto que o segundo apresentou valor de redução muito abaixo do ideal ($-1,334$ V vs EPH) [10]. Apesar da diferença, os complexos mostraram efetiva liberação do ligante em células de carcinoma de ovário, pois o mecanismo de dissociação da cumarina não era dependente da redução do cobalto e sim da troca do ligante. Isso mostra que a dissociação do ligante em um pró-fármaco pode seguir diferentes mecanismos, indicando que a avaliação do potencial de redução não é o único aspecto a ser explorado.

Em um trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo, complexos de Co^{III} contendo derivado de cumarina-N-acilhidrazona como ligantes O,N,O doadores apresentaram potenciais de redução dentro da faixa sugerida para hipóxia ($-0,371$, $-0,406$ e $-0,358$ V vs EPH), contudo, os complexos mostraram-se estáveis tanto em solução quanto em presença de

um agente redutor [109]. Desta forma, pode-se pressupor que, mesmo com a ocorrência do processo de redução do metal, a espécie de Co^{II} formada deve ser suficientemente lábil para liberar o ligante no meio.

Tabela 7: Dados eletroquímicos do ligante **HL** e dos complexos **1b-Co^{II}**, **2b-Co^{III}** e **2c-Co^{III}** em DMF seco, a 0,100 V s⁻¹. Os valores de potenciais estão expressos em V vs Fc/Fc⁺ e EPH.

		HL	1b-Co^{II}	2b-Co^{III}	2c-Co^{III}			HL	1b-Co^{II}	2b-Co^{III}	2c-Co^{III}
Potenciais redox (V) vs Fc/Fc ⁺	Ic[*]	-1,825	-1,838	-1,847	-1,850	Potenciais redox (V) vs EPH ^a	Ic[*]	-1,105	-1,118	-1,127	-1,130
	Ia[*]	-0,196	-	-	-		Ia[*]	0,524	-	-	-
	Ic	-	-0,534	-0,488	-0,646		Ic	-	0,187	0,232	0,075
	IIc	-	-	-2,015	-		IIc	-	-	-1,295	-
	IIIc	-	-2,144	-2,110	-2,155		IIIc	-	-1,424	-1,390	-1,435
	Ia	-	-0,331	-0,352	-0,491		Ia	-	0,390	0,368	0,230
	E_{1/2}^b	-1,148	-0,432	-0,420	-0,568		E_{1/2}^b	-0,428	0,288	0,300	0,152
Parâmetros de reversibilidade dos complexos											
		1b-Co^{II}			2b-Co^{III}			2c-Co^{III}			
ΔE_p		0,203			0,136			0,155			
I_{pa}/I_{pc}		0,9			0,7			0,6			

^a Valores de potencial vs EPH foram calculados a partir do potencial redox de [Fe(η⁵-C₅H₅)₂]^{0/+} +0,72 V vs EPH em DMF [145].

^b Valores de E_{1/2} para os complexos foram obtidos a partir de Ic e Ia.

4.3. Estudo de Estabilidade e Reatividade do complexo $2c-Co^{III}$

Para avaliação da estabilidade do complexo $2c-Co^{III}$ em solução e do seu comportamento frente a um agente redutor, foram realizados ensaios de liberação do ligante em solução tampão fosfato, pH 7,4, acompanhados por espectroscopia de fluorescência. A Figura 44 mostra o espectro de emissão do ligante **HL** livre e do complexo $2c-Co^{III}$ em uma solução aquosa (tampão fosfato) contendo 1% de metanol, a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

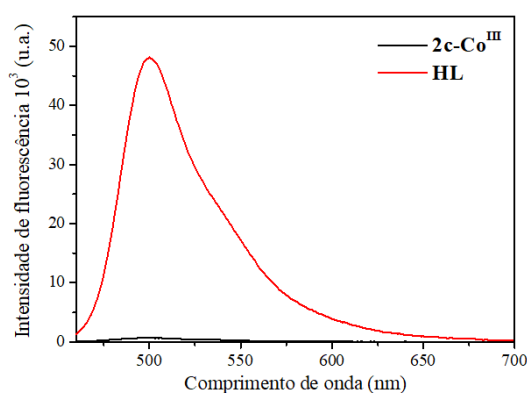


Figura 44: Emissão de fluorescência do ligante **HL** e do complexo $2c-Co^{III}$ em tampão fosfato, pH 7,4, a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, medidos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com $\lambda_{\text{exc.}} = 450 \text{ nm}$.

O ligante livre exibiu uma banda de emissão que vai da região do azul ao laranja, com intensidade máxima em 500 nm. Derivados de cumarinas contendo substituintes doadores de elétrons na posição 7 apresentam grande rendimento quântico [5,6]. Após a coordenação com Co^{III} foi observada a supressão da fluorescência de **HL**, onde o complexo exibiu uma banda com intensidade 60 vezes menor que do ligante livre nas mesmas condições experimentais.

Moléculas orgânicas com propriedades emissivas têm sua fluorescência suprimida quando são coordenadas à íons metálicos [81], como Co^{III} [47,109]. Esse fenômeno é decorrente de transferências de elétrons e de energia entre o metal e o ligante, além de interações paramagnéticas (para o caso de íons paramagnéticos) [1,80,81]. Estudos sobre complexos de Co^{III} como pró-fármacos biorredutíveis têm empregado essa propriedade para o monitoramento da liberação do ligante em um meio redutor por espectroscopia de fluorescência, onde o retorno da fluorescência da solução indica a presença do ligante livre no meio [47,36]. Da mesma maneira, foi possível monitorar a dissociação de **HL** em solução tampão do complexo $2c-Co^{III}$ contendo excesso de ascorbato de sódio como agente redutor. O

monitoramento foi realizado em atmosfera de argônio e atmosfera normal (composição atmosférica do ambiente), com objetivo de verificar a influência do oxigênio na reação de dissociação do ligante. O resultado dos estudos pode ser visualizado na Figura 45, onde estão representadas as curvas de emissão do complexo por 8,5h de monitoramento em comparação com o ligante livre.

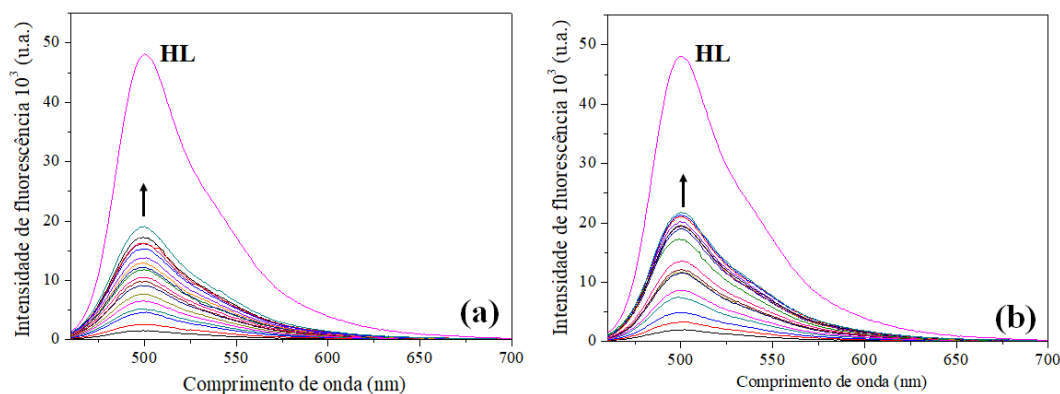


Figura 45: Sobreposição entre espectro de emissão de **HL** e monitoramento do complexo **2c-Co^{III}** ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) frente ao ascorbato de sódio ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1% de metanol, a 37 °C, com $\lambda_{\text{ex.}} = 450$ nm, onde (a): **2c-Co^{III}** sob atmosfera normal; e (b): **2c-Co^{III}** sob atmosfera de argônio. Exibidos de 460 a 700 nm.

O primeiro espectro medido da solução do complexo foi imediatamente após a adição do agente ascorbato de sódio ($t_0 =$ tempo zero) e a emissão observada corresponde à linha de menor intensidade dos gráficos representados na Figura 45. A cada 30 min um espectro de cada solução foi medido, sendo observado aumento gradativo da fluorescência em ambos os casos, que indicou a liberação de **HL** no meio.

A solução monitorada sob atmosfera normal (Figura 45a) exibiu um aumento gradativo da fluorescência até 6 h de experimento (t_{12}). Após este tempo, observou-se uma pequena diminuição na intensidade de emissão, que variou de forma irregular até a última medida ($t_{17} = 8,5$ h de monitoramento). De maneira similar, a solução sob atmosfera de argônio (Figura 45b) exibiu um aumento gradativo na intensidade de fluorescência até 5 h em presença de ascorbato de sódio. Após esse tempo, a intensidade continuou aumentando de forma mais branda, sofrendo algumas variações irregulares até o final da análise. Esse comportamento indica que o efeito do agente redutor sobre a liberação de **HL** deixa de ser linear após 6 h e 5 h de exposição do complexo **2c-Co^{III}** sob atmosfera normal e de argônio, respectivamente.

A literatura mostra, para complexos de Co^{III} contendo cumarina e antraquinona fluorescentes, que a intensidade de emissão tende a diminuir gradualmente, mantendo-se numa região próxima do máximo atingido, indicando que o efeito do ascorbato de sódio sobre o complexo atinge um limite em determinado tempo [36].

O complexo $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ também foi estudado em solução tampão, pH 7,4, na ausência de ascorbato de sódio, com objetivo de avaliar sua estabilidade e verificar se a liberação do ligante é dependente do agente redutor. A solução foi monitorada em atmosfera normal, a 37 °C, por 8,5 h e o resultado está apresentado na Figura 46.

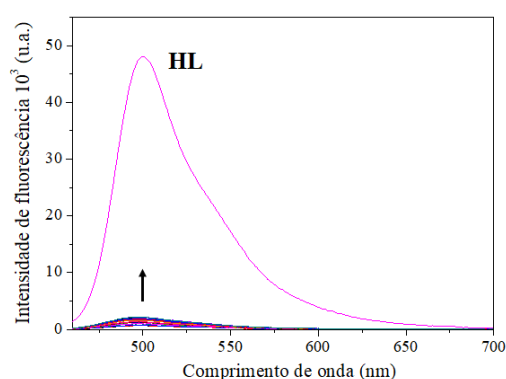


Figura 46: Sobreposição entre espectro de emissão de **HL** e monitoramento do complexo $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1% de metanol, a 37 °C, com $\lambda_{\text{ex.}} = 450 \text{ nm}$ Exibidos de 460 a 700 nm.

Apesar de ser observado um pequeno aumento na emissão da solução do complexo, a variação da intensidade máxima de fluorescência foi muito inferior àquelas observadas na presença de um agente redutor (menos que 5% da emissão do **HL** livre). Isto indica que a substituição do ligante **HL** é mínima em solução aquosa, e sugere que o complexo $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ é estável nas condições experimentais. Apesar de ainda não ser possível comprovar o mecanismo que leva a dissociação de **HL** (redox ou troca do ligante), pode-se afirmar que a liberação do ligante é dependente da presença de ascorbato de sódio. A Figura 47 mostra o percentual de retorno da fluorescência em relação ao tempo até 5 h de monitoramento das três soluções estudadas do complexo. Os percentuais do retorno de fluorescência foram determinados considerando a emissão o ligante livre como fluorescência máxima (100%).

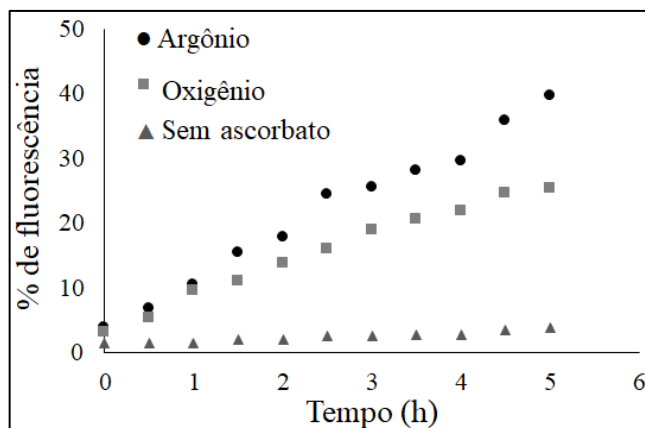


Figura 47: Comparação do % de retorno da fluorescência para o complexo **2c-Co^{III}** em solução tampão, pH 7,4, a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de ascorbato de sódio ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sob atmosfera de argônio e atmosfera normal, e na ausência do agente redutor.

A comparação entre os percentuais de emissão das soluções foi feita até 5 h de monitoramento porque este foi o tempo máximo em comum que as soluções contendo ascorbato de sódio apresentaram um aumento gradativo mais linear. No entanto, a sobreposição completa dos pontos obtidos nos estudos encontra-se em Anexo, na Figura 53.

Observou-se que o retorno da fluorescência em solução contendo ascorbato sob atmosfera de argônio foi de aproximadamente 40%, enquanto que sob atmosfera normal esse percentual chegou a 25%. A influência da atmosfera saturada com argônio sobre a dissociação do ligante sugere que a liberação de **HL** ocorre por um mecanismo redox, formando a espécie lábil de Co^{II} , seguida da substituição do ligante. Já em meio oxigenado, a reoxidação do Co^{II} formado pode ser mais rápida que a liberação de **HL**. Esse mecanismo pode ser ilustrado na Figura 48.

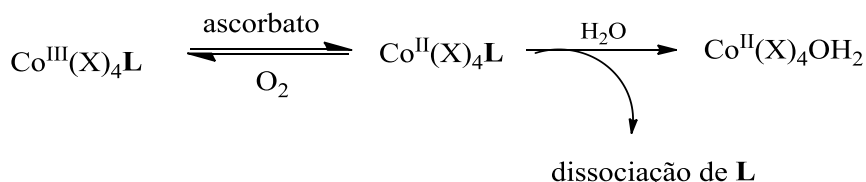


Figura 48: Esquema genérico representando a reação de dissociação do ligante em meio redutor.

Complexos de Co^{III} reportados como modelos de pró-fármacos biorredutíveis apresentam dissociação do ligante na presença de um agente redutor, e o percentual liberado

mostra-se dependente da concentração de oxigênio em muitos dos casos. Esses estudos são realizados tanto por espectroscopia de UV-Vis [49,27] quanto por fluorescência (quando o ligante é emissivo como no nosso caso) [42,47], e a maior liberação do ligante em atmosfera de argônio é atribuído a baixa reoxidação do Co^{II} a Co^{III} . Para $\mathbf{2c-Co}^{\text{III}}$ esse resultado sugere que em um ambiente celular, a liberação de **HL** poderá ser mais seletiva às regiões de baixa oxigenação (hipóxia). Estudos com intuito de avaliar esse comportamento do complexo em células com hipóxia simulada podem ser realizados posteriormente por microscopia confocal [10].

Análises de espectroscopia de massas foram realizadas com o complexo $\mathbf{2c-Co}^{\text{III}}$ em ausência e presença de ascorbato de sódio a fim de confirmar os resultados observados por fluorescência. Os espectros foram obtidos a partir de uma solução metanólica contendo 2% de DMSO e estão representados na Figura 49.

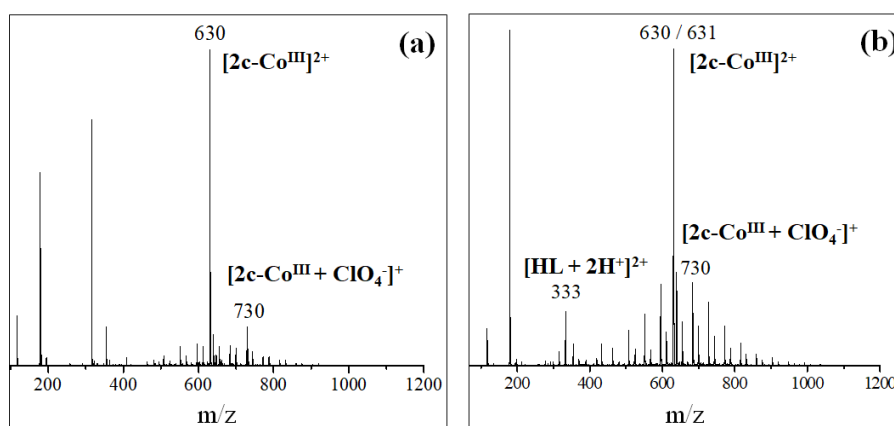


Figura 49: Espectro de massas do complexo $\mathbf{2c-Co}^{\text{III}}$ em MeOH contendo 2% de DMSO: (a) ausência e (b) presença de ascorbato de sódio.

Os dois espectros mostraram dois picos em 630 e 730 m/z referentes às espécies $[\mathbf{2c-Co}^{\text{III}}]^{2+}$ e $[\mathbf{2c-Co}^{\text{III}} + \text{ClO}_4^-]^+$ do complexo, respectivamente. Entretanto, a adição de excesso do agente redutor na solução de $\mathbf{2c-Co}^{\text{III}}$ (Figura 49a) levou ao aparecimento de um pico em 333 m/z, o qual foi associado à espécie $[\text{HL} + 2\text{H}^+]^{2+}$, confirmando a presença do ligante livre.

4.4. Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica dos complexos $\mathbf{1b-Co}^{\text{II}}$ e $\mathbf{2c-Co}^{\text{III}}$ e do ligante **HL** foram avaliadas contra células de melanoma murino metastático (B16-F10), melanoma mamário

murino (4T1) e célula não tumoral de rim de hamister (BHK-21) e comparados com a cisplatina, através dos seus valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular). Os resultados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8: IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular dos complexos **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}** e do ligante **HL**. ($\mu\text{M} \pm \text{SD}^a$).

	Células Tumorais		Célula Normal
	B16-F10	4T1	BHK-21
HL	>100	>100	>100
1b-Co^{II}	>100	31,7 ± 0,1	12,4 ± 1,3
2c-Co^{III}	45,9 ± 5,2	39,1 ± 6,6	71,2 ± 6,2
Co(ClO₄)₂·6H₂O	>100	45,1 ± 1,8	31,2 ± 3,3
Cisplatina	6.0 ± 1.0	6.2 ± 2.0	8.4 ± 1.9

^aSD – Desvio Padrão. Quadruplicata de dois experimentos independentes.

O ligante **HL** não apresentou atividade em nenhuma das células tumorais estudadas, nem toxicidade à célula normal BHK-21, entretanto a complexação ao cobalto favoreceu parcialmente a sua citotoxicidade. Os resultados mostraram que os dois complexos avaliados foram moderadamente ativos contra a linhagem de carcinoma mamário 4T1, apresentando IC₅₀ de 31,7 ± 0,1 μM e 39,1 ± 6,6 μM para **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}**, respectivamente. O complexo **1b-Co^{II}** não foi ativo contra melanoma, mostrando-se seletivo para carcinoma mamário, entretanto ele exibiu toxicidade alta para célula normal BHK-21 (IC₅₀ = 12,4 μM). Já o complexo **2c-Co^{III}** apresentou resultados mais apreciáveis, sendo moderadamente ativo em ambas células tumorais, com IC₅₀ próximos de 40 μM . Além disso, este complexo mostrou-se pouco tóxico nas células normais, o que favorece a atividade global da molécula. Comparados com a cisplatina, todos os compostos foram menos ativos contra as linhagens estudadas.

O precursor Co(ClO₄)₂·6H₂O apresentou citotoxicidade similar a dos complexos para linhagem 4T1 (45,1 ± 1,8 μM), sugerindo que o metal pode ser uma das principais influências para atividade de **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}**. Entretanto, para as células de melanoma murino (B16-F10) o precursor não foi ativo, indicando que a ação do complexo **2c-Co^{III}** contra esta linhagem celular pode estar sendo influenciada pela porção da amina Py₂en coordenada. Apesar de estabelecido na literatura que complexos muito carregados não penetram facilmente através da membrana celular [9,146], a melhor atividade global observada para o

complexo **2c-Co^{III}** pode estar associada também à sua maior carga, [Co(L)Py₂en]²⁺, quando comparada com o **1b-Co^{II}**, [Co(L)TPA]¹⁺. Vale destacar também que complexos de Co^{II} são pouco explorados como agentes anticâncer e, normalmente, são menos ativos que complexos de Co^{III}.

Devido às limitações dos ensaios de citotoxicidade, não é possível afirmar o modo como os complexos atuaram contra as células, sendo necessários estudos posteriores de *uptake* para verificar a capacidade das moléculas em atravessar a membrana celular, ensaios de interação com proteínas específicas, dentre outras possibilidades. A literatura reporta complexos de cobalto como agentes citotóxicos e as atribuições das atividades são mais exploradas a partir de ensaios mais específicos que indicam os fatores que levaram à morte celular.

Complexos de cobalto foram reportados na literatura com estudos sobre a citotoxicidade em linhagens de melanoma mamário 4T1 e célula normal de rim BHK-21. Um inibidor de metaloproteinase de matriz, *Marimastat*, apresentou melhor citotoxicidade que seu respectivo complexo de Co^{III} *in vitro* contra célula 4T1 (IC₅₀ = 0,007 ± 0,005 μM e 0,9 ± 0,1 μM, respectivamente) [83]. Os autores desse trabalho atribuíram essa diferença à coordenação do inibidor através da porção hidroxamato, que é o grupo farmacofórico da molécula. Já *in vivo* a inibição do crescimento tumoral em ratos (com a mesma linhagem celular) foi mais eficaz pelo complexo do que pelo *Marimastat* livre, indicando que o complexo de Co^{III} tem grande potencial de carrear o ligante e entregá-lo às células, sendo um ótimo modelo de pró-fármaco.

Apesar de **HL** não apresentar atividade nas células estudadas, para analisar o potencial do complexo **2c-Co^{III}** como pró-fármaco biorredutível seria necessário realizar os ensaios também em ambiente de hipóxia e monitorar a entrada do complexo nas células. Este último torna-se necessário também para determinar se o resultado obtido para **HL** está relacionado com sua inatividade efetivamente ou se trata-se de uma molécula que não atravessa a membrana celular na forma livre.

5. CONCLUSÕES

A metodologia de síntese utilizada para obtenção de **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}** foi satisfatória para formação de uma espécie de Co^{III} apenas para o segundo complexo, levando à oxidação espontânea do metal durante a reação. A capacidade acceptora π mais pronunciada no TPA (no complexo **1b-Co^{II}**) foi o principal fator apontado para a formação de um complexo de Co^{II}. O uso de Et₃N para desprotonação de **HL** foi eficiente, levando à coordenação do ligante na forma **L¹⁻** em ambos os complexos. As análises instrumentais (espectroscopia de RMN de ¹H, IV, UV-Vis e DRX) e analíticas (análise elementar de CHN, condutividade elétrica e ponto de fusão) confirmaram a obtenção de complexos puros do tipo [Co^{II}(**L**)(TPA)]ClO₄ pra **1b-Co^{II}** e [Co^{III}(**L**)(Py₂en)](ClO₄)₂ para **2c-Co^{III}**, estando em acordo umas com as outras.

O procedimento de síntese para obtenção de **2b-Co^{III}** não foi completamente satisfatório, visto que não foi observado o consumo eficiente dos reagentes durante a reação. Entretanto, a metodologia utilizada levou à formação do complexo de interesse, [Co^{III}(**L**)(TPA)](ClO₄)₂, sendo confirmado pelas análises de RMN de ¹H, IV e análise elementar de CHN. Ajustes posteriores na metodologia podem ser realizados para a obtenção do complexo puro.

Cálculos de TD-DFT corroboraram com os resultados experimentais de espectroscopia dos compostos e confirmaram a natureza da transição eletrônica no espectro de UV-Vis de **HL**, **1b-Co^{II}** e **2c-Co^{III}**. Os dados teóricos comprovaram que a transição de maior contribuição para os complexos é referente a π - π^* centrada em **L¹⁻**, mas **2c-Co^{III}** também exibiu transições do tipo transferência de carga ligante-metal acima de 400 nm.

A partir dos resultados de voltametria cíclica pode-se concluir que é possível modular o potencial redox do Cobalto a partir da variação da amina auxiliar. Esses resultados são lineares com o que vem sendo reportado na literatura, onde o maior caráter acceptor π do ligante TPA levou a potenciais catódicos menos negativos para o processo Co^{III}/Co^{II} (**1b-Co^{II}** e **2b-Co^{III}**) e o maior caráter doador σ de Py₂en refletiu em potenciais mais negativos (**2c-Co^{III}**). A influência da propriedade eletrônica do ligante sobre a redução do centro metálico permite a elaboração de pró-fármacos biorredutíveis mais seletivos à hipóxia.

Os ensaios de reatividade de **2c-Co^{III}** mostraram que o complexo apresenta parâmetros favoráveis para a proposta de pró-fármaco biorredutível, que indicou a liberação do ligante **L¹⁻** na presença de ascorbato de sódio por espectroscopia de fluorescência. A dependência da

concentração de O₂ no meio para dissociação do ligante foi favorável em relação a seletividade à hipóxia, onde o maior percentual de liberação de L¹⁻ foi observado em meio pouco oxigenado (atmosfera de argônio), indicando que a substituição do ligante no complexo ocorre preferencialmente por um mecanismo redox. Este resultado está em acordo com o valor positivo do processo Co^{III} → Co^{II} observado para **2c-Co^{III}** (+0,075 V vs EPH).

Os ensaios de citotoxicidade indicaram que a complexação de **HL** levou ao aumento da atividade contra as linhagens celulares estudadas, mas a melhor atividade global foi observada para o complexo **2c-Co^{III}**. Esses resultados podem ser mais explorados por ensaios específicos que indiquem os fatores que levaram à morte das células pelos complexos, auxiliando na atribuição da atividade em relação à estrutura e, conseqüentemente, na elaboração de espécies com maior potencial citotóxico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RENFREW, A. K., O'NEILL, E. S., HAMBLEY, T.W. Harnessing the properties of cobalt coordination complexes for biological application. **Coord. Chem. Rev.**, Sydney, v. 00, p. 0-0, 2017. ISSN 10.1016/j.ccr.2017.11.027.
- [2] SAKAR, T., BANERJEE, S. E., HUSSAIN, A. Remarkable visible light-triggered cytotoxicity of mitochondria targeting mixed-ligand cobalt(III) complexes of curcumin and phenanthroline bases binding to human serum albumin. **RSC Adv.**, v. 5, p. 16641-16654, 2015.
- [3] MUNTEANU, C. R; SUNTHARALINGAM, K., Advances in cobalt complexes as anticancer agents. **Dalton Trans.**,v. 44, p. 13796–13808, 2015.
- [4] GRAF, N.; LIPPARD, S. J., Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Adv. Drug Deliver Rev.**, v. 64, p. 993–1004, 2012.
- [5] WANG, Z.; WU, Q.; LI, J.; QIU, S.; CAO, D.; XU, Y.; LIU, Z.; YU, X.; SUN, Y., Two benzoyl coumarin amide fluorescence chemosensors for cyanide anions, **Spectrochim. Acta A**, v. 183, p. 1–6, 2017.
- [6] SOUZA, G. A., Caracterização fotofísica e morfológica de estruturas peptídicas contendo composto fluorescente para aplicação ambiental, 2014, Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiânia, 2014. Dissertação de Mestrado.
- [7] MONTAGNER, C.; SAVI, L. A.; SILVA, I. T.; KRATZ, J. M.; SMÂNIA, E. F. A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, A. Jr.; SIMÕESI, C. M. O. Vitro Cytotoxic Screening of Coumarins. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 30, p. 1669-1674, 2011.
- [8] THAKUR, A.; SINGLA, R.; JAITAK, V., Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 101, p. 476-495, 2015.
- [9] YAMAMOTO, N.; RENFREW, A.K.; KIM, B.J.; BRYCE, N.S.; HAMBLEY, T.W., Dual Targeting of Hypoxic and Acidic Tumor Environments With a Cobalt (III) Chaperone Complex. **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 11013-11021, 2012.
- [10] YAMAMOTO, N.; DANOS, S.; BONNITCHA, P. D.; FAILES, T. W.; NEW, E. J.; HAMBLEY, T. W., Cellular uptake and distribution of cobalt complexes of fluorescent ligands. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 13, p. 861–871, 2008.
- [11] LEE, J. H.; JEONG, R.; IK-SOO SHIN; KIM, H.; HONG, J., Fluorescence Turn-On Sensor for Cyanide Based on a Cobalt(II)–Coumarinylsalen Complex. **Org. Lett.**, v. 12, p. 764–767, 2010.

[12] VITÓRIO, F.; MOREIRA, T. P.; CASTRO, R. N.; GUEDES, G. P.; GRAEBINAB, C. S.; KUMMERLE, A. E., Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction, **New J. Chem.**, v. 39, p. 2323-2332, 2015.

[13] BAILE, M. B.; KOLHE, N. S.; DEOTARSE P. P.; JAIN, A. S.; KULKARNI, A. A., Metal Ion Complex -Potential Anticancer Drug- A Review. **Int. J. Pharm.**, v. 4, p. 59-66, 2015.

[14] PUCCI, D.; CRISPINI, A.; MENDIGUCHÍA, B. S.; PIRILLO, S.; GHEDINI, M.; MORELLI, S.; DE BARTOLO, L., Improving the bioactivity of Zn(II)-curcumin based complexes, **Dalton Trans.**, v. 42, p. 9679–9687, 2013.

[15] Food and Drugs Administration. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>. Acesso em: 05/01/2018.

[16] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>. Acesso em: 05/01/2018.

[17] BAR-SELA, G.; EPELBAUM.; R.; SCHAFFER, M., Curcumin as an anti-cancer agent: review of the gap between basic and clinical applications, **Curr. Med. Chem.**, v. 17, p. 190–197, 2010.

[18] BANSAL, S. S.; GOEL, M.; AQIL, F.; VADHANAM, M. V.; GUPTA, R. C., Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention, **Cancer Prev. Res.**, v. 4, p. 1158–1171, 2011.

[19] CASTONGUAY, A.; DOUCET, C.; JUHAS, M.; MAYSINGER, D., New Ruthenium(II)–Letrozole Complexes as Anticancer Therapeutics, **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 8799–8806, 2012.

[20] HUANG, Q.-M.; WANG, S.-W.; LI, Q.; PAN, W.; DENG, P.-X.; ZHOU, H.; PAN, Z.-Q., Synthesis and characterization of curcumin bridged porphyrins as photosensitizers, **Chem. J. Chin. Univers.**, v. 33, p. 732-737, 2012.

[21] ANNARAJ, J.; SRINIVASAN, S.; PONVEL, K.M.; ATHAPPAN, P. R.; Mixed ligand copper(II) complexes of phenanthroline/bipyridyl and curcumin diketimines as DNA intercalators and their electrochemical behavior under Nafion® and clay modified electrodes, **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, p. 669-676, 2005.

[22] ALIAGA-ALCALDE, N.; MARQUÉS-GALLEGO, P.; KRAAIJKAMP, M.; HERRANZ-LANCHO, C.; DULK, H.; GÖRNER, H.; ROUBEAU, O.; TEAT, S. J.; WEYHERMÜLLER, T.; REEDIJK, J., Copper Curcuminoids Containing Anthracene

Groups: Fluorescent Molecules with Cytotoxic Activity. **Inorg. Chem.**, v. 49, p. 9655–9663, 2010.

[23] PRÖHLA, M.; SCHUBERTA, ULRICH S.; WEIGAND, W.; GOTTSCHALDT, M., Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy, **Coord. Chem. Rev.**, v. 307, p. 32-41, 2016.

[24] GRAF, N.; LIPPARD, S. J., Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery, **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 993–1004, 2012.

[25] REISNER, E.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K.; POMBEIRO, ARMANDO J. L., Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs. **Inorg. Chim. Acta**, v. 361, p. 1569–1583, 2008.

[26] WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A., Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998), **Pure Appl. Chem.**, v. 70, p. 1129-1135, 1998.

[27] PIRES, B. M., GIACOMIN, L. C., CASTRO, F. A.V., CAVALCANTI, A. DOS S., PEREIRA, M. D., BORTOLUZZI, A. J., FARIA, R. B., SCARPELLINI, M., Azido- and Chlorido-cobalt complex as carrier-prototypes for antitumoral prodrugs. **J. Inorg. Biochem.**, v. 157, p. 104–113, 2016.

[28] FILES, T. W., HAMBLEY, T. W. Models of Hypoxia Activated Prodrugs: Co(III) Complexes of Hydroxamides Acids. **Dalton Trans.**, p. 1895-1901, 2005.

[29] BROWN, J. M. E WILSON, W. R., Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. **Nat Rev. cancer**, v. 4, p. 437-447, 2004.

[30] WILSON, W. R. E HAY, M. P., Targeting hypoxia in cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, p. 393-410, 2011.

[31] BUSTAMANTE, F. L. S.; SOUZA, E. T.; LANZMASTER, M.; SCARPELLINI, M., Complexos ativados por hipóxia: uma estratégia para o combate ao câncer. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, p. 138-148, 2009.

[32] ZHANG, X.; LI, X.; YOU, Q.; ZHANG, X.; Prodrug strategy for cancer cell-specific targeting: A recent overview. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 139, p. 542-563, 2017.

[33] MISTRY, I. N.; THOMAS, M.; CALDER, E. D. D.; CONWAY, S. J.; HAMMOND, E. M., Clinical Advances of Hypoxia-Activated Prodrugs in Combination with Radiation Therapy. **Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys.**, v. 98, p. 1183-1196, 2017.

[34] BUGLYÓA, P.; KACSIR, I.; KOZSUP, M.; NAGY, I.; NAGY, S.; BÉNYEI, A. C.; KOVÁTS, E.; FARKAS, E., Tuning the redox potentials of ternary cobalt(III) complexes containing various hydroxamates. **Inorg. Chim. Acta**, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.026>.

[35] GARCIA, C. V., PARRILHA, G. L., RODRIGUES, B. L., BARBEIRA, P. J. S., CLARKE, R. M., T., BERALDO, H., Cobalt(III) Complexes with 2-acetylpyridine-derived Schiff bases: studies investigating ligand release upon reduction, **Polyhedron**, v. 124, p. 86–95, 2017.

[36] KIM, B. J.; HAMBLEY, T. W.; BRYCE, N. S., Visualising the hypoxia selectivity of cobalt(III) prodrugs, **Chem. Sci.**, v. 2, p. 2135-2149, 2011.

[37] ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. DE L.; GOULART, M. O. F., Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, p. 19-35, 2002.

[38] HEFFERN, M. C.; YAMAMOTO, N.; HOLBROOK, R. J.; ECKERMANN, A. L.; MEADE, THOMAS J., Cobalt Derivatives as Promising Therapeutic Agents. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 17, p. 189–196, 2013.

[39] FARRER, N. J.; SALASSA, L.; SADLER, P. J., Photoactivated chemotherapy (PACT): the potential of excitedstate d-block metals in medicine. **Dalton Trans.**, v. 28, p. 10690–10701, 2009.

[40] ROY, S.; SAHA, S.; MAJUMDAR, R.; DIGHE, R. R.; JEMMIS, E. D.; CHAKRAVARTY, A. R., Cobalt(II) complexes of terpyridine bases as photochemotherapeutic agents showing cellular uptake and photocytotoxicity in visible light, **Dalton Trans.**, v. 40, p. 1233-1242, 2011.

[41] SAHA, S.; MAJUMDAR, R.; DIGHE, R. R.; CHAKRAVARTY, A. R., Enhanced photodynamic effect of cobalt(III) dipyrrophenazine complex on thyrotropin receptorexpressing HEK293 cells. **Metallomics**, v. 2, p. 754-765, 2010.

[42] GREEN, B. P.; RENFREW, A. K.; GLENISTER, A.; TURNER, P.; HAMBLEY, TREVOR W., The influence of the ancillary ligand on the potential of cobalt(III) complexes to act as chaperones for hydroxamic acid-based drugs, **Dalton Trans.**, v. 46, p. 15897-15918, 2017.

[43] GREENWOOD, N. N., EARNSHAW, A. Chemistry of the Elements. 2ª edição, Editora Butterwoeth-Heinemann, 1997.

[44] BONNITCHA, P. D., KIM, B. J., HOCKING, R. K., CLEGG, J. K., TURNER, P., NEVILLEA, S. M. E HAMBLEY, T. W., Cobalt complexes with tripodal ligands: implications for the design of drug chaperones. **Dalton Trans.**, v. 41, p. 11293-11304, 2012.

[45] AHN, G-O.; BOTTING, K. J.; PATTERSON, A. V.; WARE, D. C.; TERCEL, M.; WILSON, W. R., Radiolytic and cellular reduction of a novel hypoxia-activated cobalt(III) prodrug of a chloromethylbenzindoline DNA minor groove alkylator, **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 1683–1694, 2006.

[46] WARE, D. C., BROTHERS, P. J., CLARK, G. R., DENNY, W. A., PALMER, B. D. E WILSON, W. R., Synthesis, structures and hypoxia-selective cytotoxicity of cobalt(III) complexes containing tridentate amine and nitrogen mustard ligands. **J. Chem. Soc., Dalton Trans.**, p. 925–932, 2000.

[47] RENFREW, A. K., BRYCE, N. S. E HAMBLEY, T. W., Delivery and release of curcumin by a hypoxia-activated cobalt chaperone: a XANES and FLIM study. **Chem. Sci.**, v. 4, p. 3731- 3739, 2013.

[48] CHANG, J. Y., STEVENSON, R. J., LU, G. L., BROTHERS, P. J., CLARK, G. R., DENNY, W. A. E WARE, D. C., **Dalton Trans.**, v. 39, p. 11535–11550, 2010.

[49] BUSTAMANTE, F. L. S., MIRANDA, F. S., CASTRO, F. A.V., RESENDE, J. A. L. C., PEREIRA, M. D., LANZNASTER, M., A study on the properties and reactivity of naphthoquinone–cobalt(III) prototypes for bioreductive prodrugs. **J. Inorg. Biochem.**, v. 132, p. 37–44, 2014.

[50] FYLAKTAKIDOU, K. C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; LITINAS, K. E.; NICOLAIDES, D. N., Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. **Curr. Pharm.**, v. 10, p. 3813-3833, 2004.

[51] BANSAL, Y.; SETHI, P.; BANSAL, G. Coumarin: a potential nucleus for anti-inflammatory molecules. **Med. Chem. Res.**, v. 22, p. 3049–3060, 2013.

[52] KASHMAN, Y.; GUSTAFSON, K. R.; FULLER, R. W.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; CURRENS, M. J.; BUCKHEIT, R. W.; HUGHES, S. H.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. J., HIV inhibitory natural products. Part 7. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. **Med. Chem.**, v. 35, p. 2735–2743, 1992.

[53] SHIKISHIMA, Y.; TAKAISHI, Y.; HONDA, G.; ITO, M.; TAKFDA, Y.; KODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV, O.; LEE, K. H., Chemical constituents of *Prangos tschiniganica*; structure elucidation and absolute configuration of coumarin and

furanocoumarin derivatives with anti-HIV activity, **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, p. 877-880, 2001.

[54] OSTROV, D. A.; HERNANDEZ PRADA, J. A.; CORSINO, P. E.; FINTON, K. A.; LE, N.; ROWE, T.C., Discovery of novel DNA gyrase inhibitors by high-throughput virtual screening. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 3688-3698, 2007.

[55] GORMLEY, N. A.; ORPHANIDES, G.; MEYER, A.; CULLIS, P. M.; MAXWELL, A., The Interaction of Coumarin Antibiotics with Fragments of the DNA Gyrase B Protein. **Biochemistry**, v. 35, p. 5083-5092, 1996.

[56] CURINI, M.; EPIFANO, F.; MALTESE, F.; MARCOTULLIO, M. C.; GONZALES, S. P.; RODRIGUEZ, J. C., Synthesis of Collinin, an Antiviral Coumarin, **Aust. J. Chem.**, v. 56, p. 58-61, 2003.

[57] ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N., A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, p. 1175-1180, 2012.

[58] PIAZZI, L.; CAVALLI, A.; COLIZZI, F.; BELLUTI, F.; BARTOLINI, M.; MANCINI, F.; RECANATINI, M.; ANDRISANA, V.; RAMPA, A., Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 423-426, 2008.

[59] RIVEIRO, M. E.; MOGLIONI, A.; VAZQUEZ, R.; GOMEZ, N.; FACORRO, G.; PIEHL, L.; DE CELIS, E. R.; SHAYO, C.; DAVIO, C., Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 2665-2675, 2008.

[60] THAKUR, A.; SINGLA, R.; JAITAK, V., Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 101, p. 476-495, 2015.

[61] SARKER, S. D.; NAHAR, L., Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, v. 106, p. 241-304, 2017.

[62] MUSA, M. A.; COOPERWOOD, JOHN S.; KHAN, M. O. F., A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer, **Curr. Med. Chem.**, v. 15, p. 2664-2679, 2008.

[63] Food and Drugs Administration. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>. Acessado em: 04/01/2018.

[64] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=22353>. Acessado em: 04/01/2018.

[65] Bulário eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp. Acessado em: 04/01/2018.

[66] SANDHU, S.; BANSAL, Y.; SILAKARI, O.; BANSAL, G., Coumarin Hybrids as Novel Therapeutic Agents, **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 3806-3814, 2014.

[67] MARCU, M. G.; SCHULTE, T. W.; NECKERS, L., Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins, **J. Natl Cancer Inst.**, v. 92, p. 242-248, 2000.

[68] LEWIS, R. J.; SINGH, O. M.; SMITH, C. V.; SKARZYNSKI, T.; MAXWELL, A.; WONACOTT, A. J.; WIGLEY, D. B., The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography, **EMBO J.**, v. 15, p. 1412-1420, 1996.

[69] MARCU, M. G.; CHADLI, A.; BOUHOUCHE, I.; CATELLI, M.; NECKERS, L. M. J., The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone, **Biol. Chem.**, v. 275, p. 37181-37186, 2000.

[70] KUSUMA, B. R.; KHANDELWAL, A.; GUA, W.; BROWN, D.; LIU, W.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; BLAGG, B. S. J., Synthesis and biological evaluation of coumarin replacements of novobiocin as Hsp90 inhibitors, **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 1441-1449, 2014.

[71] DEVJI, T.; REDDY, C.; WOO, C.; AWALE, S.; KADOTA, S.; CARRICOMONIZ, D., Pancreatic anticancer activity of a novel geranylgeranylated coumarin derivative, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 21, p. 5770-5773, 2011.

[72] EMAMI, S.; DADASHPOU, S. CURRENT developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 102, p. 611-630, 2015.

[73] REHMAN, S. U.; CHOHAN, Z. H.; GULNAZ, F.; SUPURAN, C. T., In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes, **J. Enzym. Inhib. Med. Chem.**, v. 20, p. 333–340, 2005.

[74] REFAT, M. S.; EL-DEEN, I. M.; ANWER, Z. M.; EL-GHOL, S., Bivalent Transition metal complexes of coumarin-3-yl thiosemicarbazone derivatives: Spectroscopic, antibacterial activity and thermogravimetric studies. **J. Mol. Struct.**, v. 920, p. 149–162, 2009.

[75] RAJ, K. M., MRUTHYUNJAYASWAMY, B. H. M., Synthesis, spectroscopic characterization, electrochemistry and biological activity evaluation of some metal (II) complexes with ONO donor ligands containing indole and coumarin moieties. **J. Saudi Chem Soc.**, v. 21, p. S202–S218, 2017.

[76] MAHMOOD, K., MUDDASSAR, M., TAHIR, M. N. E SHAFIQ, Z., Coumarin-based thiosemicarbazones as potent urease inhibitors: synthesis, solid state selfassembly and molecular docking. **RSC Adv.**, v. 6, p. 63886-63894, 2016.

[77] GUEOGJIAN, K. Funcionalização de Cumarinas Via Reação de Acoplamento de Suzuki-Miyaura de Sais de Organotrifluoroboratos de Sódio, 2011, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Dissertação de mestrado, USP, São Paulo, 2011.

[78] SCHULMAN, S. G., Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: physicochemical principles and practice, 1^a edição, University of Florida, Editora Pergamon Press, 1977.

[79] JAMESON, D. M., Introduction to Fluorescence, Nova Iorque, Editora CRC Press, 2014.

[80] FABBRIZZI, L., LICCHELLI, M., PALLAVICINI, P., SACCHI, D., TAGLIETTI, A., Sensing of transition metals through fluorescence quenching or enhancement. A review. **Analyst.**, v. 12, p. 1763-1768, 1996.

[81] HARIHARAN, C.; VIJAYSREE, V.; MISHRA, A.K., Quenching of 2,5-diphenyloxazole (PPO) fluorescence by metal ions, **J. Lumin.**, v. 75, p. 205-211, 1997.

[82] RAJ, K. M., MRUTHYUNJAYASWAMY, B. H. M., Synthesis, spectroscopic characterization, electrochemistry and biological activity evaluation of some metal (II) complexes with ONO donor ligands containing indole and coumarin moieties. **J. Saudi Chem. Soc.**, v. 21, p. S202–S218, 2017.

[83] FAILES, T. W.; CULLINANE, C.; DIAKOS, C. I.; YAMAMOTO, N.; LYONS, J. G.; HAMBLEY, T. W., Studies of a Cobalt (III) Complex of the MMP Inhibitor Marimastat: A Potential Hypoxia-Activated Prodrug, **Chem. Eur. J.**, v. 13, p. 2974–2982, 2007.

[84] WHITTAKER, M.; FLOYD, C. D.; BROWN, P.; GEARING, A. J. H., Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors., **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2735-2776, 1999.

[85] MICHAELIDES, M. R.; CURTIN, M. L., Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitors research, **Curr. Pharm. Des.**, v. 5, p. 787– 819, 1999.

[86] SHINHABABU, A. K.; THAKKER, D. R., Prodrugs of anticancer agents, **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 19, p. 241–273, 1996.

[87] MANAZANARO, S.; VINCENT, M. J.; MARTIN, M. J.; SALVADOR-TORMO, N.; PÉREZ, J. M.; BLANCO, M. DEL M.; AVENDAÑO, C.; MENENDEZ, J. C.; FUENTE, J. A., Synthesis and biological evaluation of new 1,5-diazaanthraquinones with cytotoxic activity. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 6505–6515, 2004.

[88] WHEATE, N. J.; BRODIE, C. R.; COLLINS, J. G.; KEMP, S.; WRIGHT, J. R. A., DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis, **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 7, p. 627–648, 2007.

[89] MUELLER, S. O.; LUTZ, W. K.; STOPPER, H., Factors affecting the genotoxic potency ranking of natural anthraquinones in mammalian cell culture systems, **Mutat. Res.**, v. 414, p. 125– 129, 1998.

[90] DOWNWARD, A. M.; MOORE, E. G.; HARTSHORN, R. M., Photoinduced ligand release in a ruthenium(II)-cobalt(III) heterodinuclear system, **Chem. Commun.**, v. 47, p. 7692–7694, 2011.

[91] BRADLEY, D.; WILLIAMS, G.; LAWTON, M., Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. **J. Org. Chem.**, v. 12, p. A–D, 2010.

[92] HUREAU, C.; BLONDIN, G.; CHARLOT, M-F.; PHILOUZE, C.; NIERLICH, M.; CÉSARIO, M.; ANXOLABÉHÈRE-MALLART, E., Synthesis, Structure, and Characterization of New Mononuclear Mn(II) Complexes. Electrochemical Conversion into New Oxo-Bridged Mn₂(III,IV) Complexes. Role of Chloride Ions. **Inorg. Chem.**, v. 44, p. 3669–3683, 2005.

- [93] BRUKER (2007). APEX2 v2014.5-0. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [94] BRUKER (2013). SAINT v8.34A. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [95] SHELDRICK, G. M., SADABS, Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data, University of Göttingen, Germany, 1996.
- [96] SHELDRICK, G. M., Crystal structure refinement with SHELXL, *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.*, v. 71, p. 3–8, 2015.
- [97] MACRAE, C. F., BRUNO, I. J., CHISHOLM, J. A., EDGINGTON, P. R., PIDCOCK M., RODRIGUEZ-MONGE, E., L., STREEK, R. T., J. WOOD, V. P. A., WOOD, Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Cryst.*, v. 41, p. 466–470, 2008.
- [98] TURBOMOLE V6.6 2014, A development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from <http://www.turbomole.com>
- [99] FURCHE, F.; AHLRICHS, R., Adiabatic time-dependent density functional methods for excited state properties, *J. Chem. Phys.*, v. 117, p. 7433–7447, 2002.
- [100] ADAMO, C.; BARONE, V., Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model, *J. Chem. Phys.*, v. 110, p. 6158–6170, 1999.
- [101] WEIGEND, F.; AHLRICHS, R., Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 7, p. 3297–3305, 2005.
- [102] SOUZA, I. C. A.; FARO, L. V.; PIEPHIRO, C. B.; GONZAGA, D. T. G.; SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; MIRANDA, F. S.; SCARPELLINIC, M.; LANZMASTER, M., Investigation of cobalt(III)-triazole systems as prototypes for hypoxia-activated drug delivery, *Dalton Trans. Comm.*, 2016. DOI: 10.1039/c6dt02456d.
- [103] KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G., COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, v. 2, p. 799–805, 1993.
- [104] ChemCraft program. <http://www.chemcraftprog.com>. Acessado em: 07.11.2017.
- [105] GAGNE, R. R.; KOVAL, C. A.; LISENSKY, G. C., Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements, *Inorg. Chem.*, v. 19, p. 2854–2855, 1980.
- [106] CHAVES, J. D. S.; TUNES, L. G.; FRANCO, C. H. J.; FRANCISCO, T. M.; CORRÊA, C. C.; MURTA, S. M. F.; MONTE-NETO, R. L.; SILVA, H.; FONTES, A. P. S.;

ALMEIDA, M. V., Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agentes, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 127, p. 727-739, 2017.

[107] MOSMANN, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

[108] LOHANNE, J., NEVES, A. P., iniciação científica, 2014.

[109] AREAS, E. S., BRONSATO, B. J. S., PEREIRA, T. M., GUEDES, G. P., MIRANDA, F. DA S., KUMMERLE, A. E., CRUZ, A. G. B. E NEVES, A. P., Novel CoIII complexes containing fluorescent coumarin-N-acylhydrazone hybrid ligands: synthesis, crystal structures, solution studies and DFT calculations, **Spectrochim. Acta A**, v. 187, p. 130-142, 2017.

[110] GEARY, W. J., The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds, **Coord. Chem. Rev.**, v. 7, p. 81–122, 1971.

[111] OTTER, C. A.; HARTSHORN, R. M., Preparation and photochemistry of cobalt(III) amino and amino acidato complexes containing tripodal polypyridine ligands, **Dalton Trans.**, p. 150–156, 2004.

[112] CHAKRABORTY, B., PAINE, T. K., Synthesis and characterization of cobalt(II)– salicylate complexes derived from N4-donor ligands: Stabilization of a hexameric water cluster in the lattice host of a cobalt(III)–salicylate complex. **Inorg. Chim. Acta**, v. 378, p. 231–238, 2011.

[113] MASSOUD, S. S., PERKINS, R. S., LOUKA, F. R., WU XU, ROUX, A. L., DUTERCQ, Q., FISCHER, R. C., MAUTNER, F. A., HANDA, M., HIRAOKA, Y., KREFT, G. L., BORTOLOTTIO, T. E TERENZI, H., Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chloro-cobalt(II) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: synthesis, crystal structure and DNA cleavage. **Dalton Trans.**, v. 43, p. 10086–10103, 2014.

[114] AHUMADA G.; FUENTEALBA, M.; ROISNEL, T.; KAHLAL, S.; CORDOVA, R.; CARRILLO, D.; SAILLARD, J-Y.; HAMON, J-R.; MANZUR, C., Spectroscopic, structural, electrochemical and computational studies of some new 2-Thienyl-containing β -diketonate complexes of cobalt(II), nickel(II) and copper(II), **J. Mol. Struct.**, v. 1150, p. 531-539, 2017.

[115] KULAI I.; MALLET-LADEIRA, S., Synthesis and molecular structure of 2-bromo-N-(4-7-(diethylamino)-coumarin-3-yl)phenyl)propenamide: New coumarin-based fluorescent ATRP initiator, **J. Mol. Struct.**, v. 1104, p. 14-18, 2016.

[116] YU, T.; MENG, J.; ZHANG, P.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; FAN, D.; CHEN, L.; QIU, Y., Synthesis, crystal structures and photoluminescence of 7-(*N,N'*-diethylamino)-3-phenylcoumarin derivatives, **Spectrochim. Acta A**, v. 75, p. 1036–1042, 2010.

[117] JANIÁK, C., A critical account on π -stacking in metal complexes with aromatic nitrogen-containing ligands, **J. Chem. Soc., Dalton Trans.**, p. 3885–3896, 2000.

[118] ARCOS-RAMOS, R.; MALDONADO-DOMÍNGUEZ, M.; ORDÓÑEZ-HERNÁNDEZ, J.; ROMERO-ÁVILA, M.; FARFÁN, N.; CARREÓN-CASTRO, M. del P.; 3-Substituted-7-(diethylamino)coumarins as molecular scaffolds for the bottom-up self-assembly of solids with extensive π -stacking, **J. Mol. Struct.**, v. 1130, p. 914-921, 2017.

[119] SHRINER, R. L.; HERMANN, C. K. F.; MORRILL, T. C.; CURTIN, D. Y.; FUSON, R. C., *The Systematic Identification of Organic Compounds*, 8ª edição, editora Wiley John Wiley & Sons. INC, 2004.

[120] BASANAGOUDA, M., JAMBAGI, V. B., BARIGIDAD, N. N., LAXMESHWAR, S. S., NARAYANACHAR, V. D., Synthesis, structure-activity relationship of iodinated-4-aryloxymethyl-coumarins as potential anti-cancer and antimycobacterial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 74, p. 225-233, 2014.

[121] DRAGO, R. S., *Physical Methods for Chemists*, 2ª edição, Universidade de Flórida, editora Surfside, 1997.

[122] ZHANG, H.; YU, T.; ZHAO, Y.; FAN, D.; CHEN, L.; QIU, Y.; QIAN, L.; ZHANG, K.; YANG, C., Crystal structure and photoluminescence of 7-(*N,N'*-diethylamino)-coumarin-3-carboxylic acid, **Spectrochim. Acta A**, v. 69, p. 1136–1139, 2008.

[123] YU, T.; ZHANG, P.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; MENG, J.; FAN, D., Synthesis, characterization and high-efficiency blue electroluminescence based on coumarin derivatives of 7-diethylamino-coumarin-3-carboxamide, **Organic Electron.**, v. 10, p. 653–660, 2009.

[124] VALLE-BOURROUET, G.; UGALDE-SALDÍVAR, V. M.; GÓMEZ, M. ORTIZ-FRADE, L. A.; GONZÁLEZ, I.; FRONTANA, C., Magnetic interactions as a stabilizing factor of semiquinone species of lawsone by metal complexation, **Electrochim. Acta**, v. 55, p. 9042–9050, 2010.

[125] MARTINOVIC, J.; WYK, J. V.; MAPOLIE, S.; JAHEDA, N.; BAKER, P.; IWUOHA, E., Electrochemical and spectroscopic properties of dendritic cobalto-salicylaldimine DNA biosensor, **Electrochim. Acta**, v. 55, p. 4296–4302, 2010.

[126] GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, **J. Org. Chem.**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

[127] SOUZA, E. T.; CASTRO, L. C.; CASTRO, F. A. V.; VISENTIN, L. C.; PIEPHIRO, C. B.; PEREIRA, M. D.; MACHADO, S. P.; SCARPELLINI, M., Synthesis, characterization and biological activities of mononuclear Co(III) complexes as potential bioreductively activated prodrugs, **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, p. 1355–1365, 2009.

[128] FIELD, L. D.; STEREPHLL, S.; KALMAN, J. R., Organic Structures from Spectra, 4^a edição, Editora Wiley, 2008.

[129] PEREIRA, T. M., VITÓRIO, F., AMARAL, R. C., ZANONI, K. P. S., IHA, N. Y. M. E KUMMERLE, A. E., Microwave-assisted synthesis and photophysical studies of novel fluorescent N-acylhydrazone and semicarbazone-7-OH-coumarin dyes. **J. Chem.**, v. 40, p. 8846- 8854, 2016.

[130] MIRANDA, F. S.; RONCONI, C. M.; SOUSA, M. O. B.; SILVEIRA, G. Q.; VARGAS, M. D., 6-Aminocoumarin-naphthoquinone conjugates: design, synthesis, photophysical and electrochemical properties and DFT calculations. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, 2014.

[131] ZHANG, L.; XIA, Y.; LI, M.; LI, D.; HOU, R., Synthesis, photophysical and electrochemical properties of symmetric silicon-linked coumarin-oxadiazole derivatives, **Tetrahedron**, v. 72, p. 7438-7442, 2016.

[132] MIYANO, D. M.; LIMA, T.; SIMÕES, F. R.; LA-SCALEA, M. A.; OLIVEIRA, H. P. M.; CODOGNOTO, L., Electrochemical Study of Simple Coumarin and its Determination in Aqueous Infusion of Mikania glomerate. **J. Braz. Chem. Soc.**, v 25, p. 602-609, 2014.

[133] NUÑEZ-VERGARA, L. J., PARDO-JIMÉNEZ, V., BARRIENTOS, C., OLEA-AZAR, C. A., ENCINA, P. A. N., SQUELLA, J. A., Dihydropyridine-fused and pyridine-fused coumarins: Reduction on a glassy carbon electrode in dimethylformamide, **Electrochim. Acta**, v. 85, p. 336–344, 2012.

[134] KUHN, A.; ESCHWEGE, K. G. V.; CONRADIE, J., Electrochemical and density functional theory modeled reduction of enolized 1,3-diketones, **Electrochim. Acta**, v. 56, p. 6211–6218, 2011.

[135] STANIC, Z.; VOULGAROPOULOS, A.; GIROUSIA, S., Electroanalytical Study of the Antioxidant and Antitumor Agent Curcumin. **Electroanalysis**, v. 20, p. 1263–1266, 2008.

[136] AHMADI, F.; ALIZADEHA, A.A.; SHAHABADI, N.; RAHIMI-NASRABADI, M., Study binding of Al–curcumin complex to ds-DNA, monitoring by multispectroscopic and voltammetric techniques. **Spectrochim. Acta A**, v. 79, p. 1466–1474, 2011.

[137] HUSSAIN, A.; LAHIRI, D.; BEGUM, M. S. A.; SAHA, S.; MAJUMDAR, R.; DIGHE, R. R.; CHAKRAVARTY, A. R., Photocytotoxic Lanthanum(III) and Gadolinium(III) Complexes of Phenanthroline Bases Showing Light-Induced DNA Cleavage Activity. **Inorg. Chem.**, v. 49, p. 4036–4045, 2010.

[138] CHANA, S. L-F.; LAMA, T. L.; YANG, C.; LAIA, J.; CAO, B.; ZHOU, Z.; ZHU, Q., Cobalt(II) tris(2-pyridylmethyl)amine complexes [Co(TPA)X]⁺ bearing coordinating anion (X = Cl, Br, I and NCS): synthesis and application for carbon dioxide reduction, **Polyhedron**, v. 125, p. 156–163, 2017.

[139] NARULKARA, D. D.; SRIVASTAVAB, A. K.; BUTCHERC, R. J.; ANSYD, K. M.; DHURI, S. N., Synthesis and characterization of N₃Py₂ ligand-based cobalt(II), nickel (II) and copper(II) catalysts for efficient conversion of hydrocarbons to alcohols, **Inorg. Chim. Acta**, v. 467, p. 405–414, 2017.

[140] OURARI, A.; MESSALI, S.; BOUZERAF, B.; OUENNOUGHI, Y.; AGGOUN, D.; MUBARAK, M. S.; STRAWSINE, L. M.; PETERS, D. G., Synthesis, characterization, and electrochemical behavior of a cobalt(II) salen-like complex, **Polyhedron**, v. 97, p. 197–201, 2015.

[141] SHAVALEEV, N. M.; KESSLER, F.; GRÄTZEL, M.; NAZEERUDDIN, M. K., Redox properties of cobalt(II) complexes with azole-pyridines, **Inorg. Chim. Acta**, v. 407, p. 261–268, 2013.

[142] RIGA, B. A.; NEVES, M. D.; MACHADO, A. E. H.; ARAÚJO, D. M. S.; SOUZA, J. R.; NASCIMENTO, O. R.; SANTANA, V. T.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CARVALHO-JR, V. P.; GOI, B. E., Synthesis of cobalt(II)-a-diimines complexes and their activity as mediators in organometallic mediated radical polymerization of vinyl acetate, **Inorg. Chim. Acta**, v. 471, p. 620–629, 2018.

[143] R. A. KRAUSE AND K. KRAUSE, Chemistry of bipyridyl-like ligands. 2. Mixed complexes of ruthenium(II) with 2-(phenylazo)pyridine: a new π -bonding probe, **Inorg. Chem.**, v. 21, p. 1714–1720, 1982.

[144] JOHNSON, C. R.; SHEPHERD, R. E., **Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.**, v. 14, p. 339–353, 1984.

[145] MEITES, L., *Handbook of Analytical Chemistry*; editora McGraw Hill, New York, 1963.

7. ANEXOS

7.1. Difração de raios X

Tabela 9: Dados das estruturas cristalográficas, da coleta e do refinamento do complexo **1b-Co^{II}** e ligante **HL**.

Dados	1b-Co^{II}	HL
Fórmula química	C ₃₆ H ₃₈ ClCoN ₅ O ₉	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅
Massa	778,17	331,36
Sistema cristalino	Monoclinico	Triclinico
<i>a</i> /Å	11,7110 (7)	7,7899 (3)
<i>b</i> /Å	16,8296 (8)	9,1682 (4)
<i>c</i> /Å	18,3872 (10)	13,2437 (6)
<i>α</i> ^o	90	88,782 (2)
<i>β</i> ^o	105,963 (2)	74,144 (2)
<i>γ</i> ^o	90	66,916 (2)
Volume da célula unitária/Å ³	3484,2 (3)	833,07 (6)
Temperatura/K	293(2)	293(2)
Grupo de espaço	<i>P</i> 2 ₁ /n	<i>P</i> -1
Fórmula unitária por célula unitária, <i>Z</i>	4	2
Tipo de radiação	MoKα	MoKα
Coefficiente de absorção, μ/mm ⁻¹	0,74	0,75
Reflexões medidas	53671	15642
Reflexões independentes	5205	3404
<i>R</i> _{int.}	0,078	0,037
Valor final de <i>R</i> ₁ (<i>I</i> >2σ(<i>I</i>))	0,078	0,053
Valor final <i>wR</i> (<i>F</i> ²) (<i>I</i> >2σ(<i>I</i>))	0,197	0,155
Valor final de <i>R</i> ₁ (todos os dados)	0,108	0,097
Valor final <i>wR</i> (<i>F</i> ²) (todos os dados)	0,216	0,188
Ajuste sobre <i>F</i> ²	1,12	1,30

Tabela 10: Comprimentos e ângulos de ligação selecionados para a estrutura cristalográfica de **HL**.

Ligante HL			
Átomos	Comprimento (Å)	Átomos	Ângulos (°)
C7–C6	1,426 (2)	C10–C11–C12	111,00 (16)
C6–C5	1,356 (2)	O3–C10–C11	119,07 (17)
C5–C9	1,410 (2)	O3–C10–C3	120,02 (16)
C9–C1	1,404 (2)	C3–C10–C11	120,89 (16)
C1–C8	1,369 (2)	O4–C12–C11	126,0 (2)
C8–C7	1,418 (2)	O4–C12–O5	122,5 (2)
C2–O2	1,206 (2)	C11–C12–O5	111,46 (17)
C2–O1	1,391 (2)	O1–C2–O2	115,21 (15)
C10–O3	1,220 (2)	O2–C2–C3	127,60 (17)
C12–O4	1,198 (3)	C3–C2–O1	117,18 (15)
C12–C11	1,498 (3)	C4–C3–C10–O3	7,1 (3)
C11–C10	1,513 (3)	C10–C11–C12–O4	103,7 (3)

7.2. Infravermelho

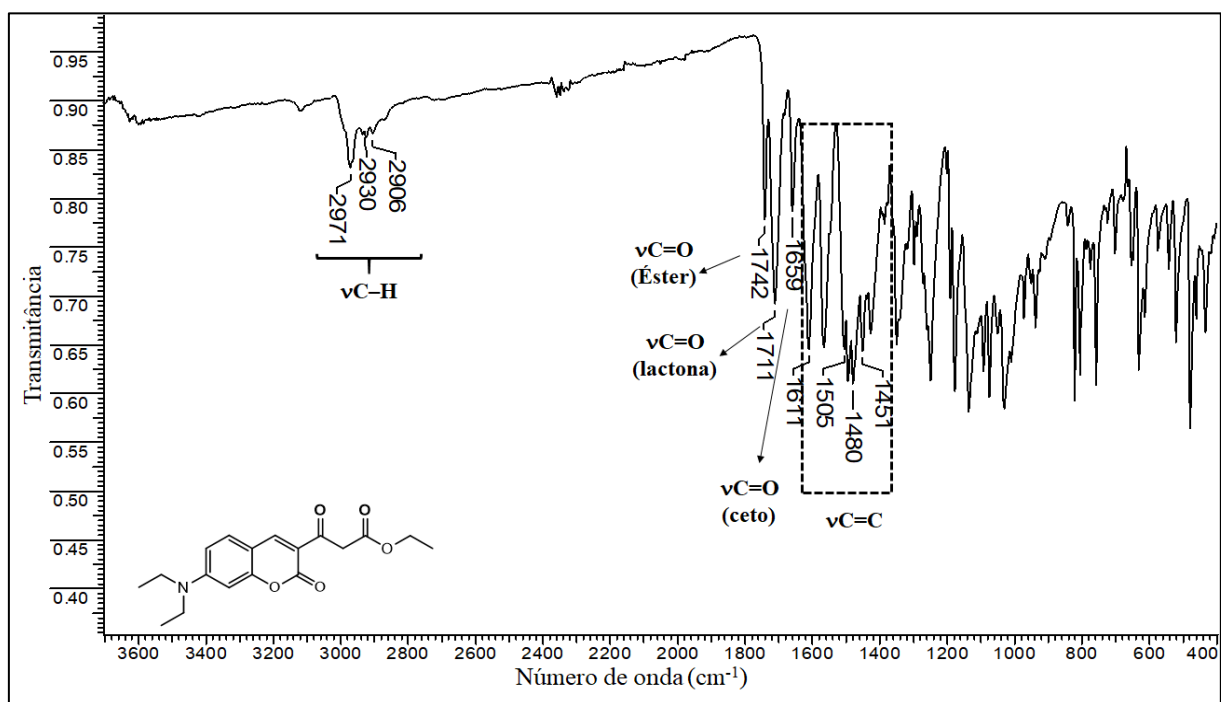


Figura 50: Espectro de infravermelho do ligante **HL** exibido na faixa de 3700-400 cm⁻¹ com destaque para as principais bandas.

7.3. Voltametria cíclica

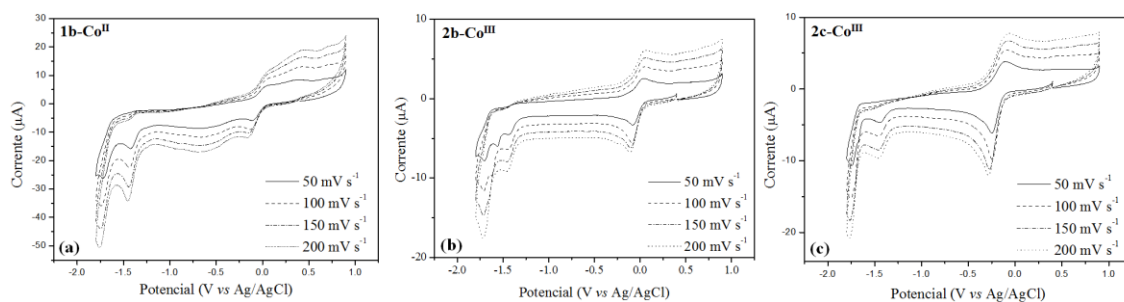


Figura 51: Voltamograma cíclico dos complexos (a) **1b-Co^{II}**, (b) **2b-Co^{III}** e (c) **2c-Co^{III}**, medidos em DMF seco a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PTBA 0,1 mol L⁻¹, em velocidades de 50 a 200 mV s⁻¹, usando eletrodo de carbono vítreo (ET); Ag/Ag+ (ER); Fio de Pt (EA) e ferroceno como referência interna.

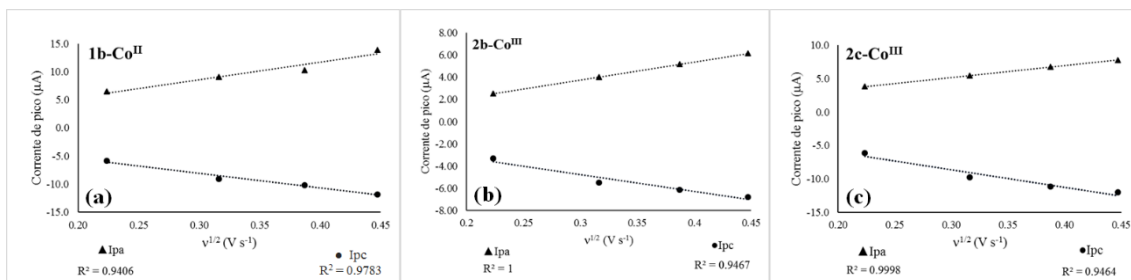


Figura 52: Dependência linear da corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) versus v^{1/2} dos complexos (a) 1b-Co^{II}, (b) 2b-Co^{III} e (c) 2c-Co^{III}.

7.4. Estudos de estabilidade e reatividade de 2c-Co^{III}

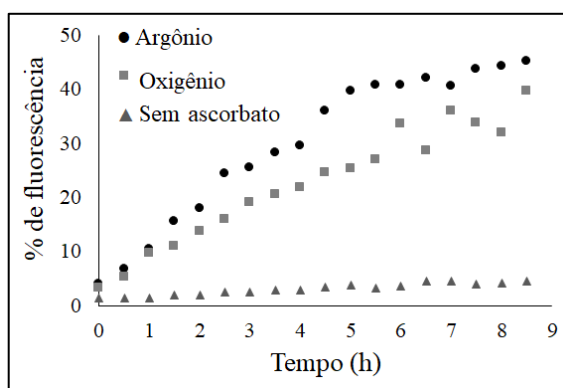


Figura 53: Comparação do retorno da fluorescência para o complexo 2c-Co^{III} monitorados por 8,5 h em solução tampão, pH 7,4, a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de ascorbato de sódio ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sob atmosfera de argônio e atmosfera normal, e na ausência do agente redutor.

7.5. Espectroscopia de RMN de ^{13}C

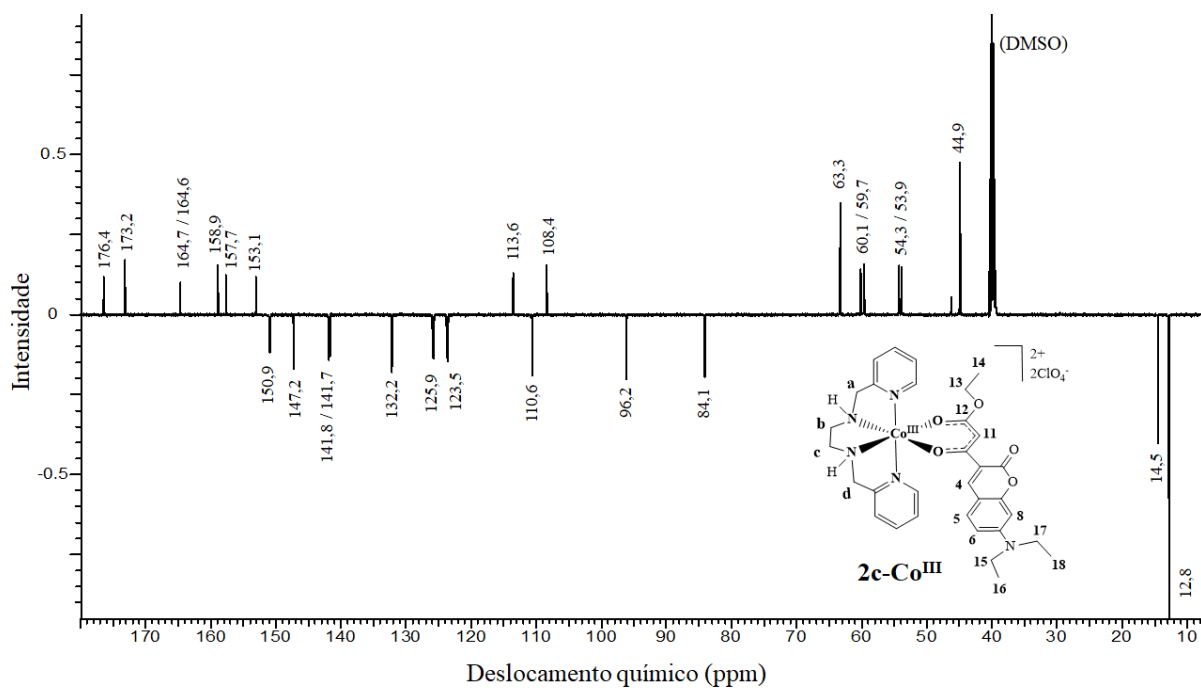


Figura 54: Espectros de RMN de ^{13}C do complexo $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ em DMSO-d_6 , de 180 a 8 ppm.

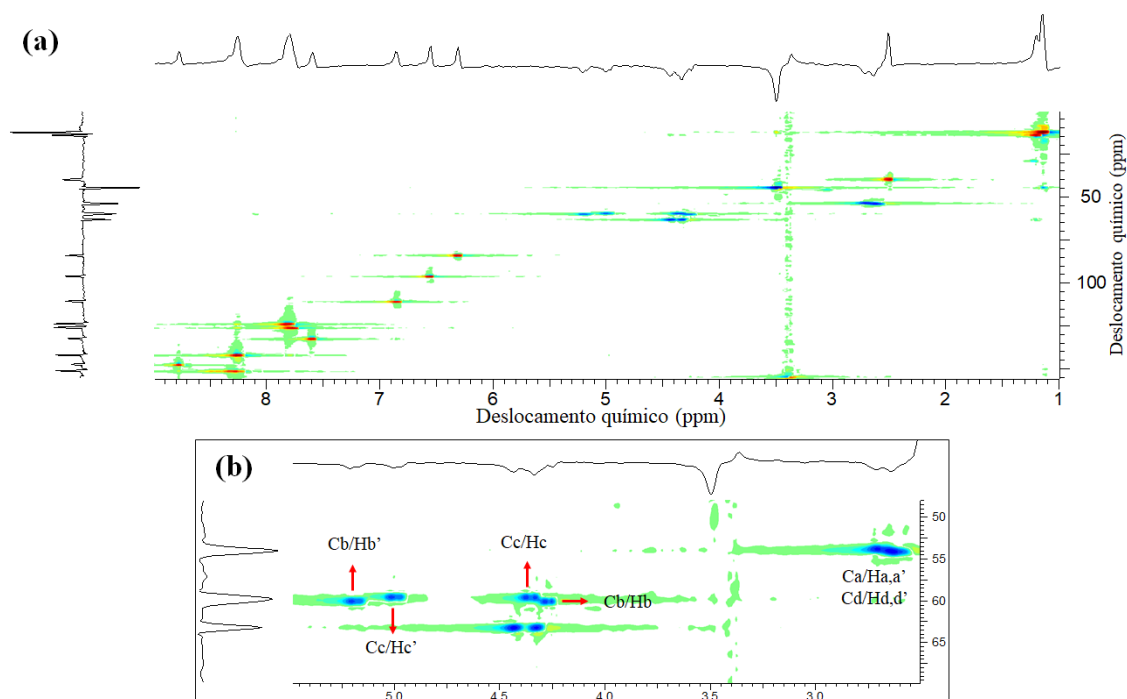


Figura 55: Espectro bidimensional de RMN de correlação de ^{13}C e ^1H do complexo $2\text{c-Co}^{\text{III}}$ em DMSO-d_6 , exibido na faixa de: (a) 1 a 9 ppm e 0,5 a 155 ppm, (b) ampliação da faixa de 2,5 a 5,5 ppm e 45 a 75 ppm.