



## NOVOS COMPLEXOS DE $\text{Ln}^{3+}$ - LAPACHOL UTILIZANDO SERRAGEM DE IPÊ-ROXO: TESTE PRELIMINAR DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Levy R. S. Bispo<sup>1</sup>; Andrei M. S. P. Silva<sup>2,6</sup>; Aluísio M. da Fonseca<sup>3,4</sup>; Jorge F. S. de Menezes<sup>1,2,5,6</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia UFRB, Centro de formação de professores CFP, Amargosa, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Química-Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas UESC, Ilhéus, Brasil;

<sup>3</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

<sup>4</sup> Programa de o Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (MASTS)

<sup>5</sup> INCT-Energia & Meio Ambiente, Universidade Federal da Bahia UFBA., Salvador, Brasil;

<sup>6</sup> INCITE-Nanotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana UEFS Feira de Santana, Brasil;

**Palavras-Chave:** Naftoquinonas, Bioinorgânica, lantanídeos

### Introdução

O aumento da demanda de novos metais e agentes inorgânicos no campo da medicina é um fator que está diretamente associado à necessidade de se desenvolver novas estratégias, capazes de explorar o potencial dessas substâncias como metalofármacos para o tratamento de doenças e enfermidades, uma vez que, elas se tornam cada vez mais resistentes a medicamentos convencionais. Um dos fatores essenciais que justificam essa aplicação é o potencial que os metais têm para gerar íons positivos em um meio aquoso ligando-se a moléculas biológicas (HAAS, 2009). Nesse contexto, compostos de coordenação resultantes da combinação de um centro metálico com moléculas orgânicas que possuem atividade biológica podem propiciar ganhos nas propriedades de interesse como atividades fungicidas, bactericidas, analgésicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais que recentemente receberam mais atenção (CHUNDAWAT, 2021).

Dentre os metais utilizados nesse campo, os lantanídeos (Ln) são promissores graças a sua variedade de aplicações. Os lantanídeos são metais de transição interna que compõem o grupo das terras raras (sendo a série lantanídica definida do lantânio (La) ao lutécio (Lu)) e tem sua química fortemente associada às suas propriedades luminescentes, oriundas das transições intraconfiguracionais (4f-4f, que ocorrem a partir do Cério ao Lutécio) sendo comumente empregados em dispositivos moleculares conversores de luz (DMCLs). No entanto, fatores como o alto número de coordenação, labilidade na substituição de ligantes e resistência dos íons  $\text{Ln}^{3+}$  a reações redox (CHUNDAWAT, 2021) tem dado a esses metais destaque na coordenação de biomoléculas com propriedades biológicas específicas que estão relacionadas a interação metal-ligante, já havendo complexos de Ln(III) com atividades biológicas significativas, com destaque à ação antioxidante (WANG, 2009).

A oxidação de uma espécie química pode ser definida como a sua conversão em um derivado com menor número de elétrons, sendo a transferência de elétrons, um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células (ALVES, 2010) Um dos efeitos resultantes desse fator é a geração de radicais livres, que desempenham variadas funções no organismo, mas que em excesso apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa

forma, se encontram envolvidos em diversas patologias como por exemplo o câncer (ALVES, 2010).

Nesse contexto, visando o desenvolvimento de novas espécies químicas bioativas a base de Ln(III) foram estudados no presente trabalho os efeitos de atividade antioxidante de quatro novos complexos metálicos sintetizados e caracterizados inicialmente por absorção no UV-vis, denominados de  $[Ln(lap)_3.(H_2O)_2]$  (em que Ln = Samário, Európio, Térbio, Gadolínio e Hlap = lapachol) utilizando como ligante bioativo o lapachol, uma 1,4-naftoquinona que foi extraída da serragem de ipê-roxo recolhida de uma serraria local e que está associada às atividades medicinais antineoplásicas, anti-inflamatórias, analgésicas e antibióticas (ARAÚJO, 2002) presentes no “chá de ipê-roxo” que faz parte da medicina tradicional das tribos indígenas brasileiras que ocupam a região da mata atlântica.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Materiais

Todos os óxidos de terra rara juntamente com o DPPH foram obtidos na Sigma-Aldrich. Carbonato de sódio (Labsynth, PA), ácido clorídrico (HCl, Merck, 37%), etanol (Sigma-Aldrich, 99,5%), acetato de etila (Sigma-Aldrich, 99,5%), metanol (Merck 99.9 %), hexano (Labsynth, PA), hidróxido de amônio (28-30% PA ACS) foram utilizados sem purificação prévia, a serragem de ipê-roxo e as tábuas de madeira foram recolhidas de uma serralheria local.

### 2.2 Medidas instrumentais

As medidas de absorção foram obtidas através de um espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific, modelo dual-beam GENESYS 10S

### 2.3 Síntese dos cloretos de Ln ( $LnCl_3.6H_2O$ )

Inicialmente, dissolve-se o óxido (1 g) de Ln (Ln =  $Eu_2O_3$ ,  $Tb_4O_7$ ,  $Sm_2O_3$ ,  $Gd_2O_3$ ) em água destilada (200 ml) em um béquer de 400 ml. Coloca-se o sistema sob agitação magnética e aquecimento a uma temperatura de 100°C. Em seguida, adiciona-se ao sistema 2 ml de HCl 37% gradualmente, até que se reste apenas uma pequena quantidade de óxido no fundo do béquer. Verifica-se o pH do sistema até atingir 5-6, quando se cessa a agitação e o aquecimento e submete-se a uma filtração simples. Evapora-se a água do filtrado até obter o cloreto de  $LnCl_3.6H_2O$

### 2.4 Obtenção do lapachol (Hlap)

Extraiu-se o lapachol seguindo a metodologia de extração ácido base proposta por Ferreira (1996) em que adiciona-se a serragem de ipê-roxo (150 g) a um béquer (2 L) seguido da adição de 1 L de solução aquosa de 1% de  $Na_2CO_3$ . Agita-se a mistura com o auxílio de um bastão de vidro por 45 min e após esse período a solução resultante de coloração avermelhada é filtrada a vácuo. Ao filtrado adicionou-se sob agitação HCl 37% até que a cor da solução vermelha se torne amarela e seja possível observar um precipitado. Realiza-se outra filtração a vácuo e o sólido obtido é então adicionado a estufa (70°C) por 1 h. O material seco é então solubilizado em acetato de etila e filtrado em uma placa de petri em que é deixado para recristalizar. Determinou-se a natureza do material por meio do ponto de fusão, cromatografia

em camada delgada (sistema de eluente: acetato de etila/hexano 3:7) e espectro de absorção UV-vis.

## 2.5 Síntese dos complexos de $[Ln(lap)_3.(H_2O)_2]$ .

Dissolve-se o cloreto de lantanídeo no mínimo possível de água destilada em um béquer (200 ml) e coloca-se o mesmo em agitação, em seguida, dissolve-se o lapachol em acetato de etila e ao mesmo adiciona-se  $NH_4OH$  1M até que a coloração da solução fique completamente avermelhada, ao fim desse procedimento adiciona-se a solução avermelhada de lapacholato (forma desprotonada do lapachol) a solução de cloreto de lantanídeo inicialmente preparada e mantém-se a solução resultante sob agitação e aquecimento de  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Após esse procedimento adiciona-se a solução resultante no freezer por um dia. No dia seguinte a solução é então filtrada a vácuo e lavada 3 vezes com água e com acetato de etila.

## 2.6 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) em que o resultado foi expresso em termos da concentração mínima necessária para obter a inibição da atividade oxidante do  $DPPH\cdot$  em 50% ( $IC_{50}$ ).

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Obtenção do lapachol

O fator de retenção da CCD (cromatografia em camada delgada) calculado para o lapachol foi de 0,53 estando de acordo com o da literatura, juntamente com a faixa de fusão que esteve entre  $139\text{--}140\text{ }^\circ\text{C}$  (ARAÚJO, 2002). O espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis da Figura 1 apresentou as bandas características do lapachol nos comprimentos de onda destacados na figura, referentes às transições de  $\pi\rightarrow\pi^*$  e  $n\rightarrow\pi^*$  que são relacionadas as ligações duplas entre carbonos e entre carbono/oxigênio presentes na estrutura da molécula que pode ser visualizada abaixo, o que indica que o material foi extraído com sucesso utilizando uma matéria prima de custo reduzido.

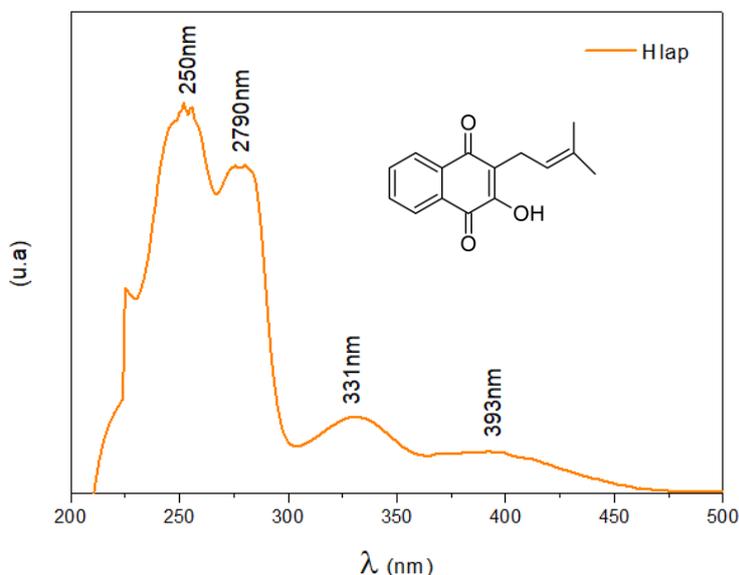


Figura 1: Espectro de absorção do lapachol (Hlap) obtido a temperatura ambiente (300K)

### 3.2 Caracterizações iniciais dos complexos de $[\text{Ln}(\text{lap})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$

Os complexos sintetizados mostraram-se insolúveis em água e acetato de etila, sendo estes os solventes utilizados na dissolução dos cloretos e do lapachol (sendo o lapacholato também solúvel em água), e apresentaram boa solubilidade em metanol e solubilidade parcial em etanol. Tendo isso em vista, os espectros de absorção UV-Vis foram obtidos dos cloretos de cada lantanídeo respectivo em solução aquosa e dos complexos em solução de metanol, e os resultados dos espectros são apresentados na Figura 2 (espectros de absorção dos cloretos) e na Figura 3 (espectros de absorção dos complexos), em que foram sobrepostos ao espectro de absorção do lapachol.

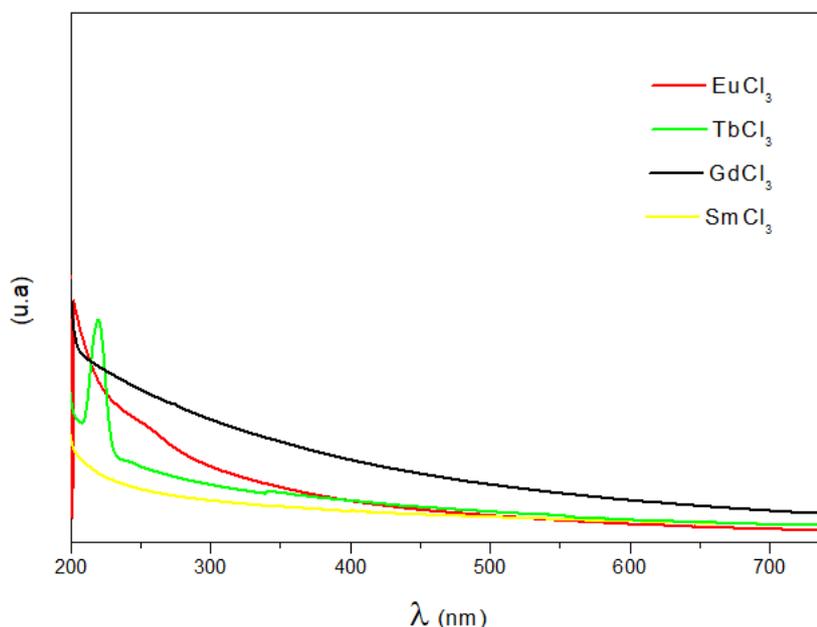


Figura 2: espectros de absorção no UV-vis dos cloretos de Ln obtidos a temperatura ambiente (300K)

Os espectros de absorção dos cloretos de samário, gadolínio e európio não apresentam bandas de absorção relevantes, isso ocorre devido ao fato das transições referentes às bandas desses metais serem fracas. Para o cloreto de európio, os valores de absorvidade molar chegam a ser inferiores  $1 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (BINNEMANS, 2015) de modo análogo aos demais, com exceção do térbio que apresenta um pico entre 210 e 240nm, condizente com a literatura (ONSTOTT e BROWN, 1958). A obtenção dos mesmos serve para que seja realizado um comparativo com os espectros dos complexos da Figura 3 em que é notória a diferença entre o perfil de absorção das espécies químicas.

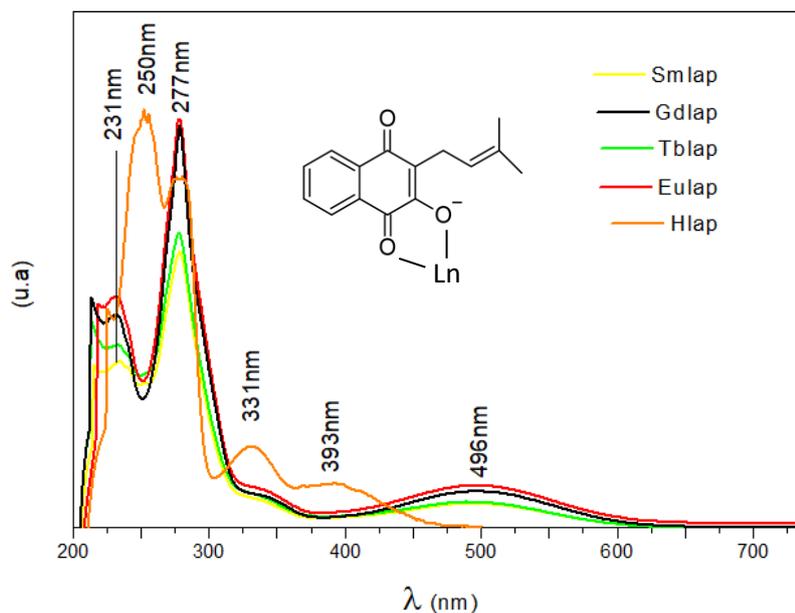


Figura 3: Espectros de absorção dos complexos obtidos a temperatura ambiente (300K) em que Ln<sub>lap</sub> é o código utilizado para referir-se aos complexos de [Ln(lap)<sub>3</sub>. (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>].

Na Figura 3 é possível notar que todos os complexos apresentaram perfil de absorção semelhante com picos de absorção de 200 a 250nm, 250 a 320nm (banda relativamente fina e intensa quando comparada às outras) e 400 a 600nm (banda larga e pouco intensa) indicando as transições de elétrons ativos na região UV que assim como o espectro de absorção do lapachol referem-se as transições que podem estar ocorrendo entre os orbitais  $\pi \rightarrow \pi^*$  ou  $n \rightarrow \pi^*$ . Comparando os espectros de absorção dos complexos com o espectro de absorção do lapachol, é possível perceber primeiramente um deslocamento batocrômico do pico em 250nm presente no lapachol para 277 nos complexos, havendo também a supressão da banda em 331nm e 393nm seguido de um aumento da absorção na região de 496nm, fator esse que pode estar relacionado com a desprotonação da hidroxila presente na estrutura do lapachol durante o processo de síntese, como pode ser observado no esquema da estrutura na Figura 3, e a posterior coordenação com o metal pode gerar possíveis deslocamentos nas transições.

O perfil de absorção dos complexos é semelhante à absorção do lapachol em valores de pH superiores a 5.3 conforme descrito na literatura por Segoloni e Di Maria (2018) em que, nessas faixas de pH há a conversão do lapachol em lapacholato, no entanto o lapacholato apresenta grande solubilidade em água enquanto o complexo não apresenta solubilidade alguma, sendo este um fator de diferenciação entre as espécies químicas.

### 3.3 Determinação de atividade antioxidante pelo método DPPH

A determinação da atividade antioxidante (%A. A) exibiu resultados diferentes para cada complexo. Para encontrar os valores de %A. A das concentrações utilizou-se a seguinte expressão descrita na equação 1:

$$\%A. A = 100 - \frac{(A-B)}{SC} \times 100$$

em que A = absorção da solução na respectiva concentração com o DPPH, B=Branco da solução na respectiva concentração sem o DPPH e SC = Absorção da Solução de DPPH sem a solução do complexo. As medidas foram realizadas utilizando soluções de complexo nas concentrações de 0,002mg/ml, 0,006mg/ml, 0,01mg/ml, 0,018mg/ml e 0,024mg/ml, a concentração da solução de DPPH usada foi de 0,6mM, em que para as soluções de complexo + DPPH adicionou-se 2,5ml de solução de Lnlap em cada respectiva concentração e 1ml da solução de DPPH, para os brancos substituiu-se o DPPH por metanol, de modo análogo, para a solução controle substituiu-se as soluções de Lnlap por metanol.

As medidas das soluções de Lnlap + DPPH foram aferidas 30 minutos após a mistura, em que ficaram sob repouso longe da luz. Com os dados de %A. A obtidos para as respectivas concentrações obteve-se a equação da reta que está descrita nos gráficos de %A. A da Figura 4:

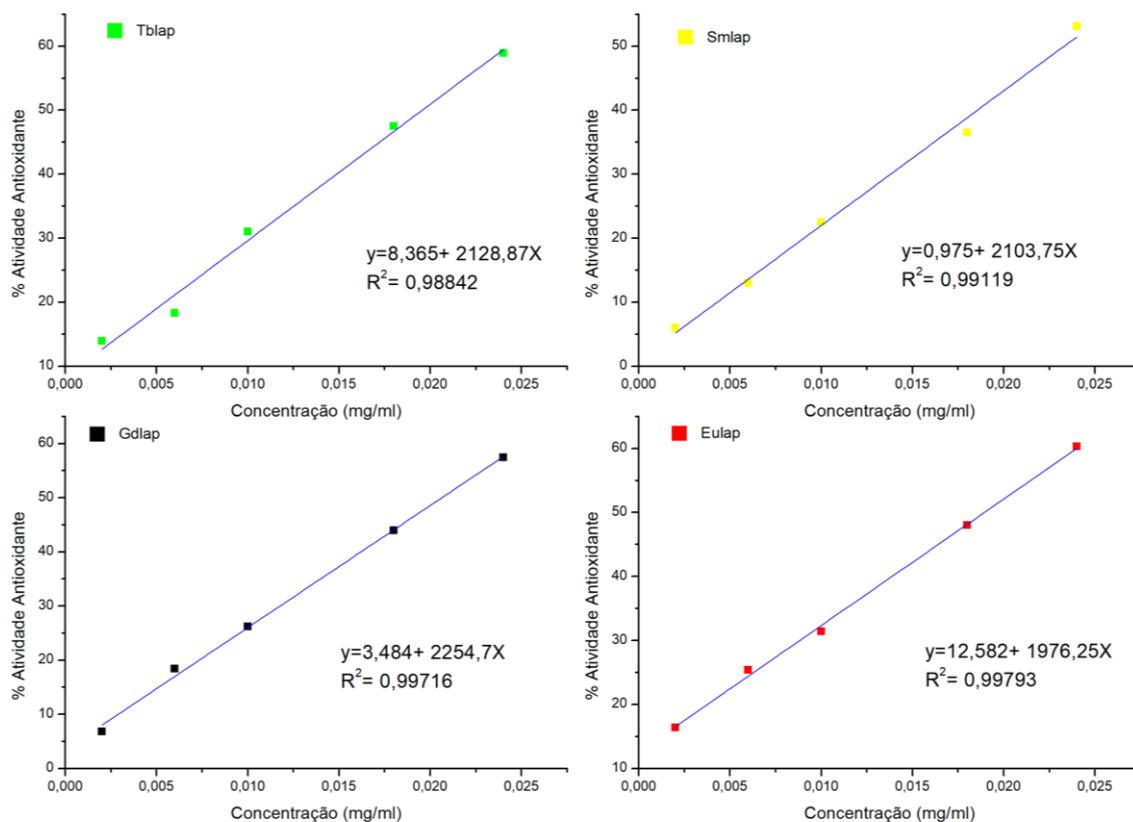


Figura 4: Regressão linear dos dados de atividade antioxidante dos complexos de Lnlap

Com os valores da equação da reta o cálculo do IC<sub>50</sub> foi realizado e apresentado na Tabela 1, abaixo:

Tabela 1: Valores de IC<sub>50</sub> dos complexos de Lnlap.

Complexo	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
[Tb(lap) <sub>3</sub> .(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ].	0,0195
[Sm(lap) <sub>3</sub> .(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ].	0,0233
[Gd(lap) <sub>3</sub> .(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ].	0,0206



[Eu(lap)<sub>3</sub>.(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>].

0,0189

Quanto menor o valor de IC<sub>50</sub> melhor é o resultado de atividade antioxidante uma vez que menos complexo foi necessário para reduzir o DPPH a 50%, nesse sentido, os complexos [Eu(lap)<sub>3</sub>.(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] e [Tb(lap)<sub>3</sub>.(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] apresentaram os melhores resultados, para o európio, essa diferença pode estar associada ao paramagnetismo de seus complexos, fator esse que já foi relatado na literatura por Chundawat (2021), característica esse que pode também ter influenciado nos valores dos demais complexos.

### Conclusões

Novas substâncias bioativas podem ser desenvolvidas fazendo uso dos conhecimentos tradicionais de propriedades farmacológicas de plantas regionais, e essa fonte de matéria prima pode ser obtida a partir da utilização de uma biomassa que seria destinada ao descarte como a serragem de lapachol utilizada no presente trabalho atendendo as demandas da agenda 2030 descrita nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis (ODS). Os testes *in vitro* também se mostram como poderosos aliados pois auxiliam no processo de identificação de atividades antioxidantes, sendo um passo inicial para posteriores testes de atividade antineoplásica *in vivo*. Nesse contexto, as perspectivas futuras deste trabalho envolvem novas caracterizações que serão realizadas para elucidação estrutural de uma possível nova classe de complexos com perfil antioxidante e ou antineoplásica.

### Agradecimentos

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESB; aos institutos: INCT-Energia & Ambiente e INCITE-FAPES Nanotecnologia.

### Referências

- ALVES, Clayton Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ARAÚJO, Evani L.; ALENCAR, João Rui B.; ROLIM NETO, Pedro J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57-59, 2002.
- BINNEMANS, Koen. Interpretation of europium (III) spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 295, p. 1-45, 2015.
- CHUNDAWAT, Narendra Singh et al. Lanthanide complexes as anticancer agents: A review. **Polyhedron**, v. 207, p. 115387, 2021.
- HAAS, Kathryn L.; FRANZ, Katherine J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. **Chemical reviews**, v. 109, n. 10, p. 4921-4960, 2009.
- ONSTOTT, E. I.; BROWN, C. J. Absorption spectra of terbium perchlorate and terbium chloride solutions. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 172-174, 1958.
- SEGOLONI, Enrico; DI MARIA, Francesco. UV-VIS spectral and GC-MS characterization of Handroanthus serratifolius (Vahl.) Grose (aka Tabebuia serratifolia (Vahl.) Nichols/Lapacho) heartwood main extractives: a comparison of protocols aimed at a practical evaluation of Lapachol and Dehydro- $\alpha$ -Lapachone content. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 76, p. 1547-1561, 2018.
- WANG, Qian et al. Synthesis, crystal structure, antioxidant activities and DNA-binding studies of the Ln (III) complexes with 7-methoxychromone-3-carbaldehyde-(4'-hydroxy) benzoyl hydrazone. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2425-2433, 2009.