

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE UM NOVO COMPLEXO MONONUCLEAR CONTENDO QUERCETINA E ÍON Ga(III)

Vanessa do Nascimento Simões, Lis Regiane Vizolli Favarin, Natália Aparecida Cabeza, Tamires Donizeth de Oliveira, Antonio Rogério Fiorucci, Jusinei Meireles Stropa, Daniela Cristina Manfroi Rodrigues, Alberto Adriano Cavalheiro e Ademir dos Anjos*

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Naviraí, 79950-000 Naviraí – MS, Brasil

Recebido em 27/2/12; aceito em 23/10/12; publicado na web em 20/2/13

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND STUDY OF THE PROPERTIES OF A NEW MONONUCLEAR QUERCETIN COMPLEX CONTAINING Ga(III) IONS. Flavonoids are one of the most important compound groups applied as medicine given their antioxidant properties, but several intrinsic properties can be improved through structural modifications to their molecules. Here, the synthesis and characterization of a new gallium (III) complex with quercetin is described. Electrochemical properties, as well as antioxidant and cytotoxic activities, were investigated and compared to the free flavonoid molecule. The mononuclear complex obtained, $[Ga(C_{15}H_9O_7)_3] \cdot 2H_2O \cdot 2CH_3OH \cdot CH_3CH_2OH$, seems more active as a DPPH radical scavenger given its lower oxidation potential compared to quercetin. The new complex cytotoxic responses have shown to be more effective than those of the free flavonoid and of lapachol used as a control.

Keywords: quercetin; gallium(III) complex; biological activities.

INTRODUÇÃO

Os flavonoides são compostos de baixa massa molar com uma estrutura base constituída por dois anéis aromáticos (A e B) ligados através de um anel pirano (C), como pode ser visualizado na Figura 1. Eles representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo amplamente distribuídos no reino vegetal.¹ Nos últimos anos essas moléculas têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, pois exibem notável variedade de atividades biológicas, físicas e farmacológicas.^{2,3} Elas podem atuar como sequestradores de radicais livres, neutralizando espécies reativas de oxigênio, e como ligantes quelatos para íons metálicos, sendo que se atribui a essas características a responsabilidade por suas propriedades benéficas.^{4,5}

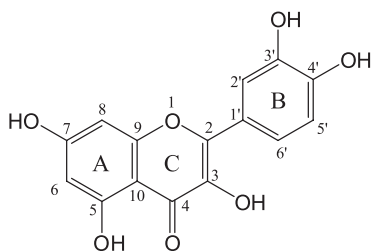


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do flavonoide quercetina

A quercetina (Figura 1) é um dos flavonoides mais presentes na dieta humana, pois é encontrada em grande quantidade nas frutas, verduras e chás. Possui propriedades de grande interesse, entre elas estão seus efeitos anticarcinogênicos, protetores do sistema renal, cardiovascular e hepático.⁶ A interação dos flavonoides com íons metálicos pode mudar as propriedades antioxidantes e alguns outros efeitos biológicos, sendo a maioria de suas propriedades muitas vezes superiores às dos compostos originais.³ Pesquisas têm mostrado que

alguns complexos metálicos com a quercetina possuem resistência à atividade neoplasmática e apresentam atividades antisséptica, anti-inflamatória e/ou antioxidante.⁷

O gálio atua em nosso organismo em focos de inflamação e infecção particularmente nos neutrófilos granulados e leucócitos polimorfonucleares.⁸ O principal interesse clínico do gálio deriva da observação de que suas propriedades metabólicas são similares às do ferro.⁹⁻¹¹ Desde os anos 70, o gálio mostrou-se eficaz na diminuição da reabsorção óssea acelerada, redução associada aos níveis plasmáticos elevados de cálcio ou inibidores da proliferação neoplásica, tornando-se o segundo íon metálico depois da platina, a ser utilizado no tratamento de câncer.¹⁰ Entretanto, seus sais trivalentes (Ga^{3+}) são fracamente absorvidos pelo intestino e alguns derivados são suscetíveis à hidrólise, diminuindo, assim, sua eficiência biológica.¹¹ Por isso o grande interesse na síntese de compostos de coordenação com o íon metálico, visando uma possível correção dessas deficiências. Estudos demonstram um aumento da biodisponibilidade e uma eficácia antitumoral superior para alguns dos complexos, comparado com o nitrato de gálio(III) e outros sais do íon metálico.¹⁰ Kopacz e colaboradores¹²⁻¹⁴ descrevem a síntese, algumas propriedades físico-químicas e estudos potenciométricos de complexos formados entre a quercetina e o ácido quercetina-5-sulfônico com metais do grupo 13 (alumínio, gálio e índio), entretanto, não fornecem uma caracterização estrutural efetiva, bem como estudos relacionados às atividades biológicas desses compostos.

Desta forma, o presente trabalho descreve a síntese, caracterização e estudo das propriedades eletroquímicas e biológicas (antioxidante e citotóxica) de um novo complexo metálico obtido a partir da reação entre o flavonoide natural quercetina e íon Ga^{3+} .

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e métodos

Todos os reagentes e solventes empregados nas sínteses e análises foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia.

*e-mail: piu_floripa@uems.br

Análise elementar, espectroscopia (IV e UV-Vis) e estudo térmico

A determinação dos percentuais de carbono e hidrogênio foi realizada em analisador elementar de CHNS Thermo Cientific Flash 2000. A análise termogravimétrica do complexo foi obtida em um analisador térmico TGA Q50 da TA Instrument, em uma faixa de temperatura de 25 a 550 °C, com gradiente de aquecimento de 20 °C min⁻¹, em atmosfera de ar sintético (massa inicial da amostra: 7,5 mg). As curvas da calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas em um calorímetro TA Instruments modelo DSC Q20, em atmosferas de nitrogênio e oxigênio (ambos com vazão de 50,0 mL min⁻¹), gradiente de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e faixa de varredura entre 25 a 550 °C. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro Thermo Nicolet Nexus 650, com acessório de detecção por fotoacústica (resolução 8 cm⁻¹, média de 256 espectros). Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) foram obtidos em um espectrofotômetro Varian modelo Cary50, sendo as análises realizadas em metanol (grau espectroscópico) e cubetas de quartzo com capacidade para 4,0 mL com caminho óptico de 1 cm.

Ensaio citotóxico

O ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* foi conduzido segundo metodologia descrita na literatura¹⁵⁻¹⁷ com modificações. Uma solução marinha foi preparada utilizando-se sal e água destilada (38 g de sal/L de água), sendo esta dividida em duas partes, uma para a eclosão dos ovos e a outra para a preparação das diluições das substâncias-teste, com pH variando entre 8-9. Em 500 mL da solução salina foram adicionados aproximadamente 1,5 g de ovos comerciais de *A. salina*, submetidos a um choque de luz com lâmpada de 100 W, por 48 h, sendo o sistema protegido de poeira e insetos. O restante da solução salina foi acondicionado em outro recipiente e também submetido às mesmas condições de iluminação e temperatura. Foram utilizados 10 mg das amostras, que foram solubilizados em metanol e o volume completado para 5 mL com água salinizada. Destas soluções foram retiradas alíquotas, transferidas para tubos de 5 mL com os volumes sendo completados com água marinha, obtendo-se concentrações de 500, 250, 100, 50 e 10 µg mL⁻¹ para cada amostra.

Nas mesmas condições preparou-se a amostra de lapachol, que foi utilizado como controle positivo, uma vez que o composto é relatado na literatura como agente citotóxico efetivo.¹⁸⁻²⁰ O controle negativo apresentava solução salina e metanol. Para cada diluição foram montadas triplicatas, nas quais foram adicionadas 10 larvas de *A. salina* com auxílio de uma pipeta Pasteur. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h em temperatura e iluminação ambientes com proteção contra poeira e insetos. Para obtenção dos valores de DL₅₀ foi utilizada a análise Probit,²¹ através do software BioStat,²² com 95% de confiança.

Avaliação da atividade antioxidante

O ensaio antioxidante quantitativo foi realizado de acordo com modificações dos métodos descritos na literatura,^{23,24} monitorando-se o consumo do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância (515 nm) de soluções metanólicas em diferentes concentrações. Utilizou-se um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 e cubetas de quartzo com capacidade para 4,0 mL com caminho óptico de 1 cm.

Construção da curva de calibração do DPPH

Primeiramente, prepararam-se 50 mL de uma solução de DPPH

em metanol na concentração de 100 µg mL⁻¹, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições em triplicata de 40, 30, 20, 10, 5 e 1 µg mL⁻¹. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância medidos a 515 nm.

Leitura das medidas de absorvâncias das amostras

Soluções do complexo e da quercetina foram preparadas em uma concentração inicial de 100 µg mL⁻¹ e diluídas nas seguintes concentrações: 1, 5, 10, 15, 20 e 25 µg mL⁻¹. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,5 mL das amostras e 2,5 mL da solução de DPPH na concentração de 40 µg mL⁻¹) foram realizadas a 515 nm após um intervalo de 30 min de reação. Foi considerada como referência de máxima absorção, 0,5 mL da solução de DPPH adicionados a 2,5 mL de metanol. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{Rem}), conforme a Equação 1:

$$\% \text{DPPH}_{\text{Rem}} = [\text{DPPH}]_{T=t} / [\text{DPPH}]_{T=0} \times 100 \quad (1)$$

onde $[\text{DPPH}]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com as amostras e $[\text{DPPH}]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 µg mL⁻¹.

Os valores de DPPH no meio, após a reação com a amostra, foram calculados substituindo-se os valores das leituras obtidas para absorvância na equação da curva analítica. A partir dos valores de % DPPH_{Rem} calculou-se a concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), graficando a porcentagem de DPPH_{Rem} versus as concentrações de cada amostra. Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação 2:

$$\% \text{AA} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

onde A₀ é absorvância do DPPH em metanol; A é a absorvância da mistura DPPH, metanol e amostra, ambos os casos após 30 min de reação; e % AA é a atividade antioxidante em porcentagem. Com os percentuais das atividades antioxidantes das amostras foi construído um gráfico da % AA versus a concentração de cada amostra.

Estudos eletroquímicos

O comportamento redox da quercetina e do complexo foi investigado por voltametria cíclica em potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab PGSTAT 302 interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES (Versão 4.9) para aquisição dos dados. Os experimentos foram realizados em solução de acetonitrila sob atmosfera ambiente. Foi usado um sistema convencional de três eletrodos, composto por um eletrodo de carbono vítreo (diâmetro de 2,0 mm) como eletrodo trabalho, um eletrodo de Ag/Ag⁺ usado como eletrodo de referência e um fio de platina usado como eletrodo auxiliar (contraeletrodo). O eletrodo de trabalho foi cuidadosamente polido antes de cada experimento com alumina, lavado com água bidestilada e posteriormente seco. Para este sistema, foi usada uma célula convencional com capacidade máxima de 10,0 mL para as medidas. Uma solução de hexafluorofosfato de tetrabutylamônio (0,1 mmol L⁻¹) foi utilizada como eletrólito suporte. Para monitorar o eletrodo de referência utilizou-se o par redox ferrocínio/ferroceno (Fc⁺/Fc) como padrão interno²⁵ (onde E_{1/2(Fc⁺/Fc)} = 0,950 V vs Ag/Ag⁺ com Δ_{ep} = 0,120 V).

Síntese do complexo

O complexo $[\text{Ga}(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_7)_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{CH}_3\text{OH} \cdot \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ foi obtido reagindo-se o flavonoide quercetina com o sal nitrato de gálio(III), $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), em uma estequiometria 3:1 (ligante:metal). A uma solução de 0,064 g de nitrato de gálio(III) em 10 mL de água, com agitação e aquecimento, adicionou-se uma solução da quercetina (0,226 g) solubilizada em aproximadamente 10 mL de etanol. A solução amarela continuou sob agitação e leve aquecimento por 20 min, sendo adicionadas à mesma aproximadamente 3 gotas de uma solução tampão pH 4,5 (acetato de sódio/ácido acético), o que resultou na mudança de coloração para laranja. Manteve-se a reação em refluxo por 4 h. Após alguns dias obteve-se a formação de um sólido amorfo de coloração verde, o qual foi filtrado, lavado com metanol a frio, seco e armazenado para a realização das análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise elementar, espectroscopia (IV e UV-Vis) e estudo térmico

O complexo foi obtido com grau de pureza adequado, o que é demonstrado pela análise elementar. A análise elementar apresenta resultado concordante com a fórmula molecular $\text{GaC}_{49}\text{H}_{45}\text{O}_{26}$ (MM = 1.119,60 g mol⁻¹; calculado: C = 52,57% e H = 4,05%; encontrado: C = 52,25% e H = 3,87%), o que indica que o complexo mononuclear obtido foi isolado em uma estequiometria 3:1 (ligante/metal), contendo ainda duas moléculas de água, duas de metanol e uma de etanol como compostos de solvatação. Os resultados obtidos através da análise termogravimétrica reforçam esta sugestão.

Macedo e colaboradores²⁶ em um estudo sobre a caracterização térmica da quercetina mostraram que a mesma apresenta diferentes estágios de degradação, dependentes da atmosfera gasosa utilizada e velocidade de aquecimento, e que são relacionados com a perda de água (estágio inicial), transição de fase (estágio intermediário) e decomposição da quercetina (estágio final). O pico de transição de fase (curva DSC) ocorre sem a perda de massa (na curva TG), mas com variação de calor, o que evidencia uma mudança estrutural. Quando se compara o perfil das curvas de TG e DSC obtidas para o complexo (Figura 2) com o que é relatado para a quercetina, verifica-se uma similaridade nos estágios de decomposição, com uma diferença no início e final das curvas em virtude da presença de diferentes solventes e presença do íon metálico. A etapa de degradação inicial é caracterizada por processos endotérmicos relacionados com a evaporação de compostos orgânicos e água de solvatação, que se inicia em 26 °C e se estende até 130 °C. Observam-se inflexões na curva dTG em 45 e 79 °C, indicando que no processo de evaporação há diferentes compostos envolvidos. A primeira perda de massa (6,0%) está relacionada a duas moléculas de metanol, enquanto a subsequente (7,6%) se relaciona com a mistura azeotrópica formada por duas moléculas de água e uma de etanol. Na etapa seguinte, similarmente ao que ocorre na quercetina livre,²⁶ verifica-se um pico de transição de fase em 265 °C (curva DSC), que ocorre sem perda de massa na curva TG, e que está atrelada a uma mudança estrutural, inalterada mesmo após o processo de coordenação. A etapa final, entre 325 e 525 °C, mostra o processo exotérmico associado à decomposição das moléculas de quercetina, com uma perda de massa total de 78,7%. As três subetapas nesta decomposição estão associadas a diferentes estágios da combustão, como função da estabilidade térmica de distintas partes da molécula do ligante quercetina. A perda total de massa encontrada na TG foi de 92,3% e o total calculado foi de 93,4% com um resíduo final referente ao óxido de gálio. Estes resultados mostram boa concordância com a fórmula encontrada na

análise elementar de CHN e permitiram estabelecer a estequiometria do complexo, o qual apresenta três moléculas de quercetina coordenadas ao centro metálico e moléculas de água, metanol e etanol como espécies de solvatação.

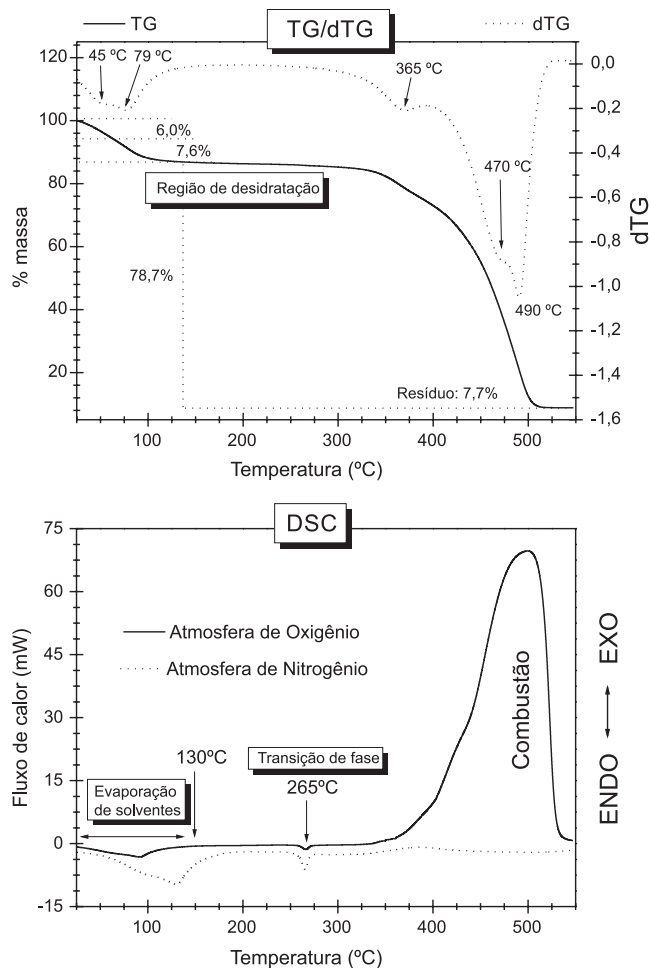


Figura 2. (Superior) Curva TG do complexo em atmosfera ambiente na faixa de temperatura 25-550 °C, coeficiente de aquecimento de 20 °C min⁻¹ com uma massa inicial da amostra de 7,5 mg. (Inferior) Curvas DSC do complexo sob atmosferas de nitrogênio e oxigênio (fluxo de 50,0 mL min⁻¹) com gradiente de aquecimento 20 °C min⁻¹ e faixa de varredura entre 25 a 550 °C

Uma análise comparativa entre os espectros na região do infravermelho do ligante e do complexo indica a presença das principais bandas (Tabela 1), com algumas pequenas distinções oriundas do processo de coordenação. A presença da absorção em 448 cm⁻¹ possivelmente está relacionada à formação das ligações Ga-O, pois relatos na literatura indicam que este tipo de ligação é encontrado em uma faixa de 450 a 470 cm⁻¹, entretanto, com outros tipos de ligantes.^{10,27} Uma outra alteração é verificada na banda atribuída ao grupo carbonila que é deslocada para um menor comprimento de onda no complexo (1666 cm⁻¹ na quercetina livre para 1650 cm⁻¹ no complexo). Isto pode ser indicativo da coordenação do ligante ao íon metálico via oxigênio carbonílico (na posição 4 do anel C, Figura 1) uma vez que resultados similares foram encontrados para outros complexos com flavonolatos.^{2,3,5,28-35} Nota-se um aumento significativo da ordem de ligação da banda referente à deformação da ligação C-OH_{fenol}, de 1319 cm⁻¹ no ligante para 1342 cm⁻¹ no complexo, conforme pode ser verificado na Figura 3. Esse fato pode estar relacionado à coordenação de um dos grupamentos fenólicos presentes na quercetina (3-OH, 5-OH, 3'-OH e/ou 4'-OH). Como o grupo 3-hidroxil possui

um próton mais ácido comparativamente aos demais (o que o torna um quelante mais efetivo),^{28,29} espera-se que seja um dos primeiros sítios, juntamente com o grupo 4-oxo, a serem envolvidos no processo de coordenação. Os demais grupos fenólicos não devem estar envolvidos devido à menor acidez e ao possível impedimento espacial ocasionado pela primeira complexação.^{2,29} Estudos com íons metálicos e flavonoides (principalmente a quercetina) têm indicado uma predominância nessas posições de coordenação, o que também é corroborado pelos dados obtidos através da espectroscopia eletrônica.^{2,3,5,28-35} A frequência de vibração para $\nu(\text{C-O-C})$ também foi alterada após a coordenação do flavonoide, conforme pode ser visualizado na Figura 3. A partir desses resultados pode-se inferir que cada quercetina provavelmente se coordenou ao íon Ga(III) como um ligante bidentado através da carbonila (4-oxo) e do grupo 3-hidroxil. A presença das moléculas de metanol e etanol na estrutura do complexo promove uma ligeira modificação no perfil do espectro infravermelho, principalmente nas regiões esperadas para os modos vibracionais desses solventes.²⁸ A presença dessas moléculas é devidamente confirmada pelas análises elementar e térmica.

Tabela 1. Principais bandas e atribuições, em cm^{-1} , dos espectros no infravermelho para a quercetina e o complexo (detecção por fotoacústica com resolução 8 cm^{-1} e média de 256 espectros)

Quercetina	Complexo	Atribuições
3394	~3442 – 3285	$\nu(\text{O-H})$
1666	1650	$\nu(\text{C=O})$
1250	1271	$\nu(\text{C-O-C})$
1319	1342	$\delta(\text{C-OH}_{\text{fenol}})$
--	448	$\nu(\text{M-O})$

O espectro eletrônico da quercetina em metanol (Figura 4, inserção) apresenta duas bandas de absorção relacionadas com as transições $\pi \rightarrow \pi^*$: uma em 375 nm ($\epsilon = 24.167 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$), denominada banda I, correspondente ao sistema conjugado entre o anel B e a carbonila do anel C (sistema cinamoil), e outra em 255 nm ($\epsilon = 24.580 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$), banda II, referente ao sistema conjugado entre o anel A e a carbonila do anel C (sistema benzoil).^{2,28,29} Os espectros na região do UV-Vis em metanol mostram diferenças significativas entre a quercetina pura e o complexo (Figura 4), demonstrando claramente a coordenação do centro metálico: verificam-se o deslocamento batocrômico da banda I e o surgimento de uma nova

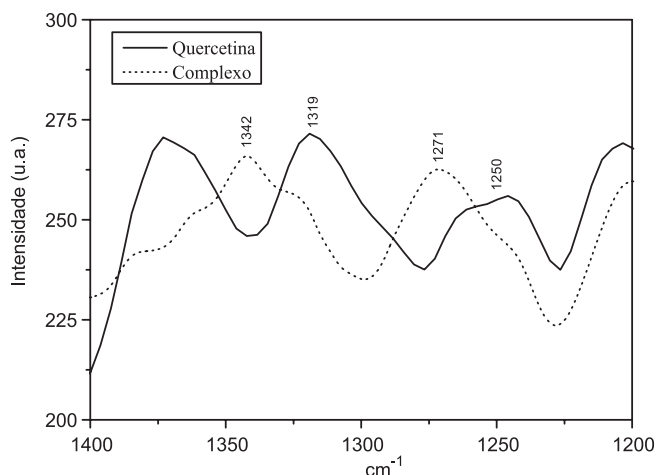


Figura 3. Espectro no infravermelho comparando a quercetina livre (linha sólida) e o complexo (linha tracejada) na região entre 1400 e 1200 cm^{-1}

banda em 437 nm (com um ombro em $\approx 501 \text{ nm}$). A nova banda em 437 nm ($\epsilon = 30.500 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) sugere que o íon Ga(III) esteja ligado ao grupo fenólico 3-OH e à carbonila 4-oxo do anel C.³⁶ Segundo Dehghan,²⁸ as evidências que suportam esta sugestão estão relacionadas aos seguintes fatos: o grupo 3-OH é um melhor agente quelante (o que está relacionado com sua maior acidez frente aos demais) e a deslocalização dos elétrons do oxigênio do grupo 3-OH é maior, o que facilita a deslocalização dos elétrons π . O deslocamento batocrômico que ocorre na banda I (de 375 nm na quercetina para 388 nm no complexo) pode ser explicado pela interação do Ga^{3+} com o grupo 3-hidroxil da quercetina, resultando em uma redistribuição eletrônica entre a molécula do flavonoide e o íon metálico, formando um sistema ligante π estendido.²⁸ Baseado em relatos da literatura, sugere-se que o processo em $\approx 501 \text{ nm}$ (ombro) pode estar relacionado ao fenômeno da fluorescência, que é explicado pela excitação e relaxamento dos elétrons do ligante ($n \rightarrow \pi^*$), influenciados pelo centro metálico.¹² As mudanças após a coordenação são concordantes com o que é descrito em outros trabalhos que estudaram complexos metalo-flavonolatos, indicando, por exemplo, um deslocamento para menor comprimento de onda da banda referente ao sistema cinamoil (banda I). Como citado anteriormente, o grupo 3-hidroxil possui um próton mais ácido; dessa forma, os grupos 3-OH e 4-oxo são os primeiros sítios de coordenação envolvidos no processo de complexação e influenciam no deslocamento da banda. O grupo hidroxila localizado na posição 5 não é envolvido no processo de coordenação devido a sua menor acidez e ao impedimento espacial ocasionado pela primeira complexação.^{28,29}

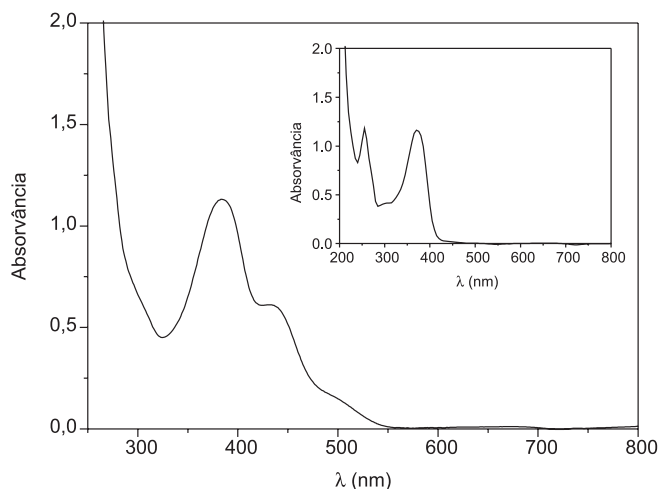


Figura 4. Espectro eletrônico do complexo em CH_3OH (concentração: $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; caminho óptico: 1 cm). Inserção: espectro eletrônico da quercetina em metanol (concentração: $4,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; caminho óptico: 1 cm)

Ensaio citotóxico

Vários estudos correlacionam a toxicidade sobre a *A. salina* com atividades antifúngica, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida e, também, como avaliação prévia de uma possível atividade antitumoral. O microcrustáceo pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (DL_{50}), que é a dose efetiva para matar 50% das larvas de *A. salina*.¹⁵⁻¹⁷

Os resultados obtidos no ensaio com *A. salina* (Tabela 2) indicam que todas as amostras se mostraram ativas contra o microcrustáceo, pois apresentaram resultados de DL_{50} inferiores a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, que é a concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa.¹⁵ O pré-controle feito com metanol e água salina não apresentou influência sobre os resultados, já que nenhuma larva morreu nessa mistura. O

valor de DL_{50} para o complexo ($DL_{50} = 22,51 \mu\text{g mL}^{-1}$) indica uma melhor resposta citotóxica do composto, sendo consideravelmente menor que o da quercetina pura ($DL_{50} = 398,94 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o do lapachol ($DL_{50} = 64,85 \mu\text{g mL}^{-1}$). O valor de DL_{50} obtido para o lapachol é um valor muito próximo ao encontrado na literatura ($68 \mu\text{g mL}^{-1}$),³⁷ o que indica boa adequação nos procedimentos experimentais utilizados.

Tabela 2. Resultados do teste de citotoxicidade sobre *A. salina*, relativos à quercetina, ao complexo e à substância controle (lapachol)

Amostras	DL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Intervalo de confiança (95%)
Complexo	$22,51 \pm 0,11$	7,57 – 40,97
Quercetina	$398,94 \pm 0,04$	339,42 – 496,86
Lapachol	$64,85 \pm 0,05$	48,56 – 98,52

* Dados apresentados como médias \pm desvio padrão de 3 repetições.

Avaliação da atividade antioxidante

O modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH é baseado na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil em reagir com substâncias doadoras de hidrogênio, incluindo compostos fenólicos.^{24,38} Quando uma determinada substância que age como doadora de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina (forma reduzida) é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta para amarela pálida. É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres de amostras.³⁹ Os resultados da avaliação da atividade antioxidante (%AA) do complexo e do controle positivo, determinados pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na Figura 5, mostrando que o complexo apresentou boa atividade antioxidante, chegando a ser mais efetivo que a quercetina pura em todas as concentrações testadas.

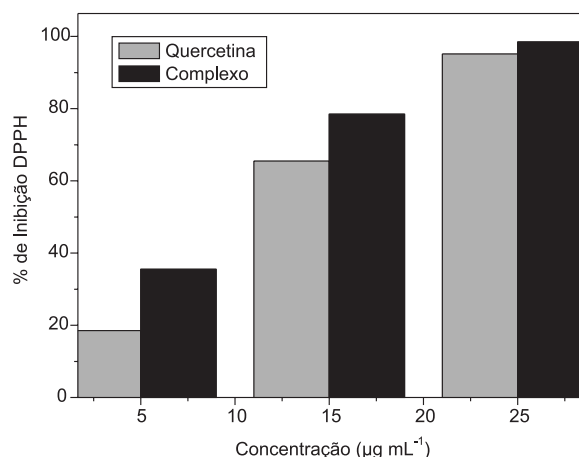


Figura 5. Porcentagem da atividade de inibição do DPPH da quercetina e do complexo

A concentração de cada amostra necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, CE_{50} , também indicou a potencialização da atividade antioxidante do flavonoide quercetina após a complexação com o íon Ga^{3+} . O complexo apresentou um valor de CE_{50} de $0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$. Comparativamente, a quercetina apresentou um valor de $2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, similar aos encontrados na literatura,^{24,40} que variam de $2,20$ a $2,34 \mu\text{g mL}^{-1}$. A capacidade dos flavonoides de atuarem como antioxidantes depende da sua estrutura molecular; entretanto, há muitas divergências quanto ao mecanismo envolvido no processo.⁴¹⁻⁴⁵ Alguns autores sugerem que a atividade está relacionada

com a posição e o número de grupamentos hidroxílicos presentes na estrutura do flavonoide. A alta atividade antioxidante poderia ser atribuída, principalmente, à contribuição significativa dos grupos 3',4'-OH. A quercetina em reação com o radical DPPH doaria um dos átomos de hidrogênio e se transformaria em uma espécie radicalar (Q^*) ou uma semiquinona, sendo esta reação atribuída à presença das hidroxilas em posição *orto* no anel B. Entretanto, recentemente, Foti e colaboradores⁴⁵ sugeriram que a etapa inicial do processo deve ser representada pela transferência de elétrons entre o DPPH e o oxigênio fenólico na posição C-7, em vez da abstração de um dos átomos de hidrogênio dos grupos 3',4'-OH.

O aumento da atividade antioxidante da quercetina após a complexação sugere que o íon metálico Ga^{3+} pode alterar as propriedades químicas do ligante quercetina, retirando densidade eletrônica dos grupos fenólicos circunvizinhos, fazendo com que se tornem mais ácidos e, conseqüentemente, mais susceptíveis de serem abstraídos ou permitirem a transferência eletrônica. Dados experimentais, utilizando diversos íons metálicos, têm demonstrado que os complexos são consideravelmente mais eficientes sequestradores de radicais livres do que os flavonoides livres.^{3,7,46} Os resultados obtidos abrem uma nova perspectiva para o uso do complexo de gálio como fármaco, visando a prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo. No entanto, o teste utilizando o DPPH não permite uma definição dos efeitos antioxidantes, sendo necessário um estudo utilizando um sistema biológico, como células, para determinar se este composto poderá ser utilizado para esta finalidade.

Estudos eletroquímicos

O comportamento eletroquímico da quercetina e do complexo foi investigado através da técnica de voltametria cíclica. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 6. Os processos foram obtidos em solução de acetonitrila, utilizando carbono vítreo como eletrodo de trabalho, Ag/Ag^+ como eletrodo de referência, fio de platina como eletrodo auxiliar e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBAPF₆ como eletrólito suporte. Todos os valores dos potenciais foram referenciados versus Fc^+/Fc ,²⁵ onde $E_{1/2}(\text{Fc}^+/\text{Fc}) = 0,950 \text{ V vs Ag}/\text{Ag}^+$ ($\Delta E_p = 0,120 \text{ V}$) (Figura 6, inserção). No voltamograma cíclico obtido para a quercetina em solução de acetonitrila ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$)

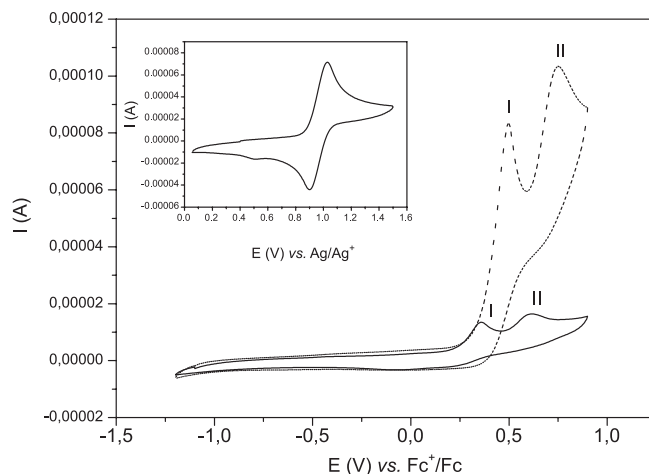


Figura 6. Voltamogramas cíclicos da quercetina (linha tracejada) e do complexo (linha sólida). Inserção: voltamograma do par redox ferrocínio/ferroceno (Fc^+/Fc) utilizado como padrão interno ($E_{1/2} = 0,95 \text{ V vs. Ag}/\text{Ag}^+$). Condições experimentais similares para todos os voltamogramas (solvente: acetonitrila; eletrodo trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referência: Ag/Ag^+ ; eletrodo auxiliar: fio de platina; eletrólito suporte: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ TBAPF₆; velocidade de varredura de 25 mV s^{-1})

para uma velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ são observados dois processos de oxidação irreversíveis em 0,553 V vs Fc⁺/Fc (E_{paI}) e 0,807 V vs Fc⁺/Fc (E_{paII}). De acordo com dados já reportados na literatura,⁴⁷⁻⁵⁰ o processo no pico I (E_{paI}) corresponde à oxidação do grupo 3',4'-di-hidroxil no anel B da quercetina, em uma reação envolvendo os prótons. O grupo hidroxila na posição 5- do anel A é oxidado depois e corresponde ao pico II (E_{paII}), enquanto a reação de oxidação envolvendo o grupo 7-hidroxil não é observada no voltamograma cíclico nas condições utilizadas. Quanto à reversibilidade das reações que ocorrem nesses processos de oxidação, ainda é contraditória e depende muitas vezes dos parâmetros experimentais empregados.^{47,48,50}

No voltamograma cíclico do complexo, seguindo as mesmas condições experimentais utilizadas para a quercetina pura, verificam-se os mesmos processos descritos anteriormente, entretanto, com diferenças nos valores dos potenciais. Esses resultados mostraram uma diminuição considerável dos potenciais de oxidação (pico I: 0,305 V vs Fc⁺/Fc e pico II: 0,565 V vs Fc⁺/Fc) comparados ao ligante livre, pois a coordenação com o íon metálico faz com que os processos de oxidação ocorram mais facilmente.² Não há nenhum processo relacionado diretamente ao íon metálico Ga(III), uma vez que o mesmo é inerte eletroquimicamente.⁵¹

Através de técnicas eletroanalíticas, como a voltametria cíclica, é possível determinar a atividade antioxidante de substâncias. Essas técnicas podem correlacionar potenciais de oxidação, intensidade de corrente e/ou outros parâmetros eletroquímicos com a capacidade antioxidante, sendo mais seletivas e sensíveis que os métodos espectrofotométricos. Quanto menor o valor de E_{pa}, maior é o poder doador de elétron da espécie em estudo e, portanto, teoricamente, maior seu poder antioxidante.³⁹ Assim, o complexo sintetizado mostrou-se um antioxidante mais eficaz do que a quercetina livre. Estes resultados concordam com o teste antioxidante utilizando o radical livre estável DPPH.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude do crescente interesse na química de complexos metal-flavonolatos, o presente trabalho estudou a interação entre a quercetina e o íon gálio(III), sendo que as análises físico-químicas realizadas sugerem a coordenação do Ga³⁺ através do grupo carbonila (4-oxo) e do oxigênio fenólico (na posição 3 do anel C) do flavonoide, formando um complexo mononuclear com fórmula [Ga(C₁₅H₉O₇)₃].2H₂O.2CH₃OH.CH₃CH₂OH. O complexo apresentou resposta citotóxica frente ao crustáceo *A. salina* mais efetiva quando comparado ao flavonoide puro e ao lapachol (utilizado como controle). No estudo da atividade antioxidante baseado no radical livre DPPH, observou-se um aumento nessa propriedade quando se comparou o complexo ao flavonoide livre, o que demonstra claramente a importância da coordenação do íon metálico para o processo. A atividade antioxidante do complexo também foi avaliada do ponto de vista eletroquímico, confirmando o resultado obtido com o teste utilizando o radical DPPH. Os resultados mostraram valores relativamente mais baixos nos potenciais de oxidação do complexo comparativamente aos da quercetina pura, o que indica que pode se oxidar com mais facilidade que o flavonoide e, conseqüentemente, ser melhor agente antioxidante. Todos estes resultados abrem espaço para a busca de outras atividades do complexo sintetizado, bem como uma melhor investigação das propriedades antioxidante e citotóxica, visando uma possível aplicação farmacêutica.

AGRADECIMENTOS

Às agências CAPES e FUNDECT.

REFERÊNCIAS

1. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento*, 5^a ed., Ed. da UFSC: Florianópolis, 2004, cap. 23.
2. Souza, R. F. V.; Giovani, W. F.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, *61*, 1985.
3. Dolatabadi, J. E. N.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 227.
4. Franzoi, A. C.; Peralta, R. A.; Neves, A.; Vieira, I. C.; *Talanta* **2009**, *78*, 221.
5. Berreau, L. M.; Grubel, K.; Rudzka, K.; Arif, A. M.; Klotz, K. L.; Halfen, J. A.; *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 82.
6. Behling, E. B.; Sendão, M. C.; Francescato, H. D. C.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P.; *Alim. Nutr.* **2004**, *15*, 285.
7. Zhay, G.; Ma, H.; Duan, Y.; Zhu, W.; *Zir. Kex.* **2010**, *23*, 310.
8. Bernstein, L. R.; *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 669.
9. Melnikov, P.; Malzac, A.; Coelho, M. B.; *Acta Ortop. Bras.* **2008**, *16*, 54.
10. Bandoli, G.; Dolmella, A.; Tisato, F.; Porchia, M.; Refosco, F.; *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 56.
11. Silva, F. A. A. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Lisboa, Portugal, 2008.
12. Kopacz, M.; Bartecki, A.; *Koord. Khim.* **1978**, *4*, 1845.
13. Kopacz, M.; Bartecki, A.; *Koord. Khim.* **1979**, *5*, 367.
14. Bujonek, B.; Kopacz, M.; *Pol. J. Chem.* **1991**, *65*, 845.
15. Meyer, N. B.; Ferrigni, N. R.; Jacobson, J. E.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L.; *Plan. Méd.* **1982**, *45*, 31.
16. Siqueira, J. M.; Bomm, M. D.; Pereira, N. F. G.; Garcez, W. S.; Boaventura, M. A.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 557.
17. Citó, A. M. G. L.; Souza, A. A.; Lopes, J. A. D.; Chaves, M. H.; Costa, F. B.; Souza, S. A. A.; Amaral, M. P. M.; *An. Assoc. Bras. Quím.* **2003**, *52*, 74.
18. Ferreira, M. L.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; da Silva, A. A.; Pereira, R. C.; *Acta Scient.* **2000**, *22*, 999.
19. Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V. U.; Miana, G. A.; Green, I. R.; *Arkivoc* **2007**, *part ii*, 145.
20. Maeda, M.; Murakami, M.; Takegami, T.; Ota, T.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *229*, 232.
21. Finney, D. J.; *Probit Analysis*, 3rd ed.; Cambridge Univ. Press: Cambridge, 1971.
22. *BioStat® for Windows*, Versão 5.8.3.0, AnalystSoft Inc., Vancouver, 2009.
23. Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araujo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.
24. Barbosa, J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2009.
25. Gagné, R. R.; Koval, C. A.; Lisensky, G. C.; *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 2854.
26. Costa, E. M.; Barbosa Filho, J. M.; Nascimento, T. G.; Macedo, R. O.; *Thermochim. Acta* **2002**, *392-393*, 79.
27. Mohammadi, K.; Thompson, K. H.; Patrick, B. O.; Storr, T.; Martins, C.; Polishchuk, E.; Yuen, V. G.; McNeill, J. H.; Orvig, C.; *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2217.
28. Dehghan, G.; Khoshkam, Z.; *Food Chem.* **2012**, *131*, 422.
29. Bukhari, S. B.; Memon, S.; Tahir, M. M.; Bhangar, M. I.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2009**, *71*, 1901.
30. Tian, Q.-L.; Liao, S.-H.; Lu, P.; Liu, L.-J.; *Chin. J. Chem.* **2006**, *24*, 1388.
31. Woznicka, E.; Kopacz, M.; Umbreit, M.; Klos, J.; *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 774.
32. Li, J.; Kang, J.; Lu, J.; Li, X. Z.; Tang, J. L.; Zhang, H. Q.; Zhang, Y. H.; *J. Lumin.* **2009**, *129*, 906.
33. Kopacz, M.; Nowak, D.; *Microchem. J.* **1993**, *47*, 338.

34. Kopacz, M.; Nowak, D.; *Polish. J. Chem.* **2000**, *74*, 303.
35. Zhou, J.; Wang, J.; Tang, N.; *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *83*, 41.
36. Ahmadi, S. M.; Dehghan, G.; Hosseinpourfeizi, M. A.; Ezzati, N. D. J.; Kashanian, S.; *DNA Cell. Biol.* **2011**, *30*, 517.
37. Galotta, A. L. Q. A.; Boaventura, M. A. D.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 610.
38. Roginsky, V.; Lissi, E.; *Food Chem.* **2005**, *92*, 235.
39. Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2202.
40. Chua, M.; Tung, Y.; Chang, S.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 1918.
41. Birt, D. F.; Hendrich, S.; Wang, W.; *Pharmacol. Ther.* **2001**, *90*, 157.
42. Yang, C. S.; Landau, J. M.; Huang, M. T.; Newmark, H. L.; *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 381.
43. Materska, M.; *Pol. J. Food Nut. Sc.* **2008**, *58*, 407.
44. Wang, L.; Tu, Y. C.; Lian, T. W.; Hung, J. T.; Yen, J. H.; Wu, M. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9798.
45. Foti, M. C.; Daquino, C.; Dilabio, G. A.; Ingold, K. U.; *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4826.
46. Malešev, D.; Kuntic, V.; *J. Serb. Chem. Soc.* **2007**, *72*, 921.
47. Brett, A. M.; Ghica, M. E.; *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1745.
48. Medvidović-Kosanović, M.; Šeruga, M.; Jakobek, L.; Novak, I.; *Croat. Chem. Acta* **2010**, *83*, 197.
49. Xu, G. R.; In, M. Y.; Yuan, Y.; Lee, J. J.; Kim, S.; *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*, 889.
50. Timbola, A. K.; de Souza, C. D.; Giacomelli, C.; Spinelli, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 139.
51. dos Anjos, A.; Bortoluzzi, A. J.; Caro, M. S. B.; Peralta, R. A.; Friedemann, G. R.; Mangrich, A. S.; Neves, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1540.