

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“SÍNTESE DE COMPLEXOS DE MG(II), ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA”**

JOSENILTON DE JESUS SANTOS*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientadora: Dra. Rose Maria Carlos

*bolsista CNPq

São Carlos - SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Josenilton de Jesus Santos, realizada em 09/03/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Francisco de Assis Marques (UFPR)

Profa. Dra. Renata Zachi de Osti (UFMT)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Gostaria de dedicar este trabalho
aos meus pais (Gabriel e Lindalva),
às minhas irmãs Daniela, Carla e Paula,
à minha companheira Karen,
pelo apoio em todos os momentos.
Muito obrigado a todos vocês!*

*Deixe-me dizer algo para você que você já sabe:
O mundo não é feito apenas de sol e arco-íris.
É um lugar sujo e desagradável, e não importa o quão duro você seja,
ele vai te bater até que você esteja de joelhos
e vai te manter assim permanentemente se você permitir.
Nem você, eu ou ninguém vai bater tão forte quanto a vida.
Mas a questão não é o quão forte você bate,
mas sim o quanto você aguenta apanhar e continuar seguindo em frente.
O quanto você resiste e continua seguindo adiante.
É assim que se vence uma luta!*

(Rocky Balboa)

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Rose Maria Carlos pela orientação, paciência e confiança durante esses dois anos de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, obrigado pelos conhecimentos compartilhados, como também aos momentos de risadas.

Ao Rafa principalmente pela paciência e por sempre estar me ajudando.

A Karen pelo companheirismo em todos os momentos.

Ao departamento de Química da UFSCar pelo apoio institucional.

A todos os professores e funcionários que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

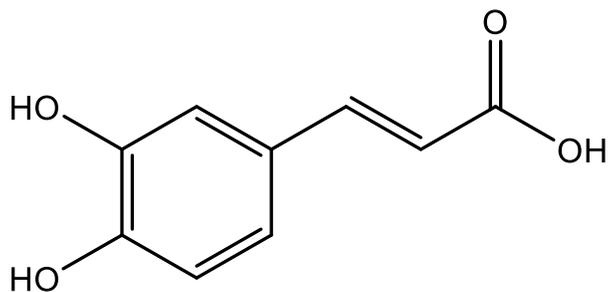
À minha família pelo apoio de sempre! À minha mãe, Lindalva e meu pai Gabriel, que sempre me motivaram a seguir em frente, muito obrigado! Sem vocês eu não estaria aqui.

Às minhas irmãs Dani, Carla e Paula por sempre quererem o melhor para mim e sempre me incentivando a querer algo a mais, obrigado pelo apoio (todo apoio, seja financeiro ou emocional hahahah, amo vocês!).

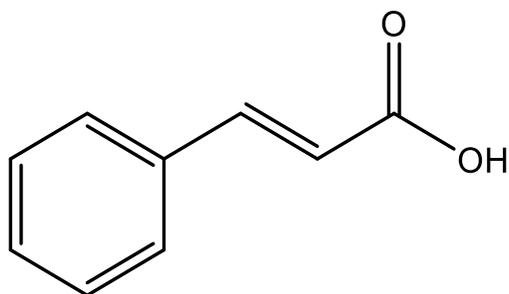
Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

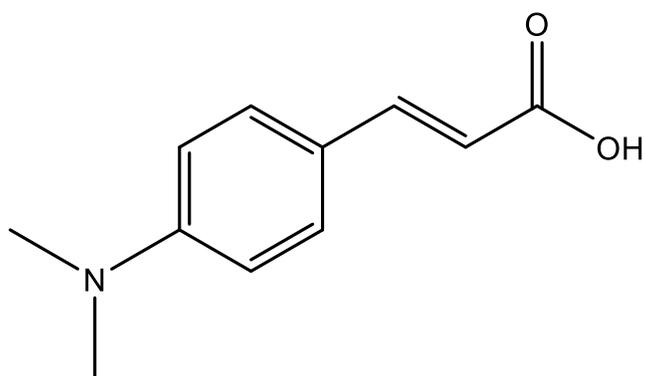
ATP	Trifosfato de adenosina
caf	Ácido Cafeico
cin	Ácido Cinâmico
dmaca	Ácido 4-(dimetilamino) cinâmico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EACH (E.e)	Enzima acetilcolinesterase do peixe elétrico <i>Electrophorus electricus</i>
Hesp	Hesperidina
IC ₅₀	Concentração do composto que inibe 50 % em relação ao controle
IV	Infravermelho
Met	L-Metionina
Mg(II)	Magnésio com estado de oxidação II
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mmol	1×10 ⁻³ mol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NBT	Nitroazul de tetrazólio
phen	1,10-fenantrolina
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TEA	Trietilamina
TEMP	2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol
TEMPO	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
UV-Vis	Ultravioleta-visível
λ _{ex}	Comprimento de onda de excitação

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS

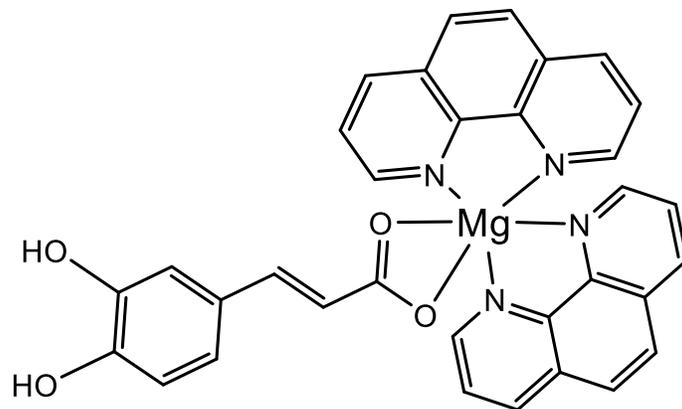
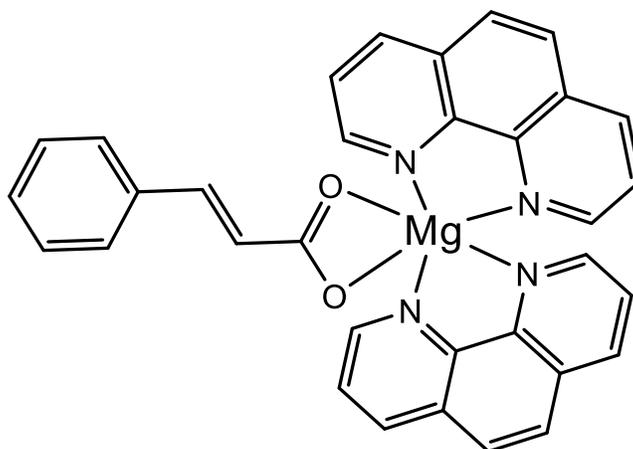
Ácido cafeico

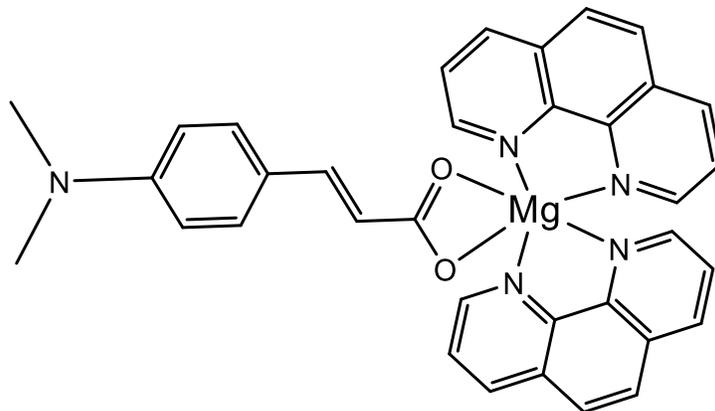


Ácido cinâmico

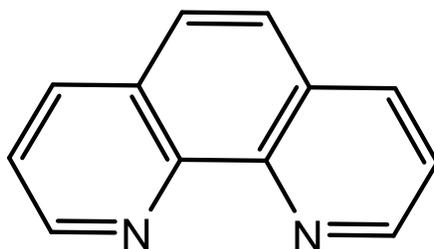


Ácido 4-(dimetilamino) cinâmico

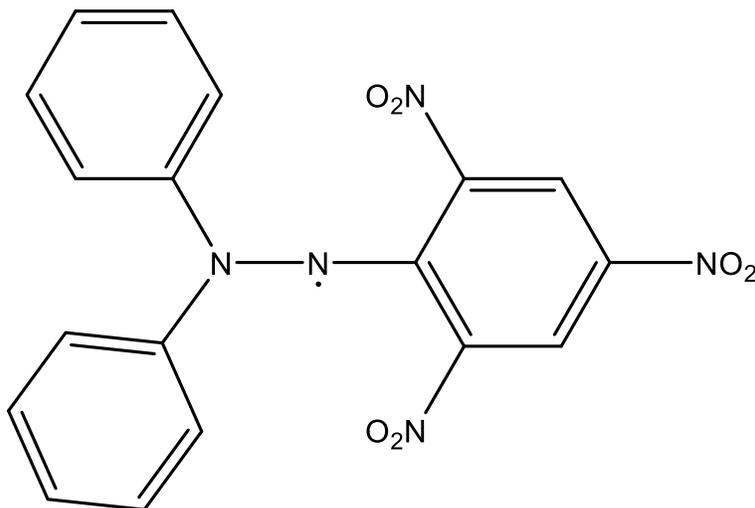
 $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$  $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$



[Mg(phen)₂(dmaca)]⁺



1,10-fenantrolina



DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando a formação das espécies reativas do oxigênio: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.....5
- FIGURA 2: Explosão respiratório (ou burst respiratório) em fagócitos (a). Remoção catalítica de ERO's pelas enzimas antioxidantes (b) e (c).7
- FIGURA 3: Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan.....21
- FIGURA 4: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante ácido cafeico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (b) obtido em pastilha de KBr. 24
- FIGURA 5: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante ácido dmaca (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b) obtido em pastilha de KBr.24
- FIGURA 6: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante ácido cinâmico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (b) obtido em pastilha de KBr.25
- FIGURA 7: Espectros de RMN ^1H 400 MHz em DMSO- d_6 para o ligante (a) 1,10-fenantrolina, (b) ácido cafeico e (c) complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$27
- FIGURA 8: Espectros de RMN ^1H 400 MHz em DMSO- d_6 para o ligante (a) 1,10-fenantrolina, (b) ácido cinâmico (c) complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$29

FIGURA 9: Espectros de RMN ^1H 400 MHz em DMSO- d_6 para o ligante (a) 1,10-fenantrolina, (b) ácido 4-dimetil cinâmico (c) complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$	31
FIGURA 10: Espectro de Massas do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$	33
FIGURA 11: Espectro de Massas do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$	35
FIGURA 12: Espectro de Massas do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$	37
FIGURA 13: Espectros de DOSY ^1H para os complexos $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (a), $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b) e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (c) em DMSO- d_6	40
FIGURA 14: Espectro de absorção UV-Vis do ligantes ácido cafeico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (b) em tampão fosfato pH 7,4.	41
FIGURA 15: Espectro de absorção UV-Vis do ligante dmaca (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ em tampão fosfato pH 7,4.	42
FIGURA 16: Espectro de absorção UV-Vis do ligante ácido cinâmico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (b) em tampão fosfato pH 7,4.	42
FIGURA 17: Espectro de emissão do ligante livre ácido cafeico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (b) em diferentes pH com $\lambda_{\text{ex}} = 323 \text{ nm}$	44
FIGURA 18 : Voltamograma cíclico para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ em tampão fosfato pH 7,4 e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	45
FIGURA 19: Voltamograma para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ em diferentes pH e velocidade de varredura 100 mV s^{-1}	47

- FIGURA 20: Voltamograma para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ em diferentes pH e velocidade de varredura 100 mV s^{-1}49
- FIGURA 21: Reação de oxidação para as espécies H_3CAF (a), H_2CAF^- (b), HCAF^{2-} (c) e CAF^{3-} (d).50
- FIGURA 22: Espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ no escuro e após 150 minutos de irradiação.52
- FIGURA 23: Espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 do complexo $\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ no escuro e após 150 minutos de irradiação.52
- FIGURA 24: Espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ no escuro e após 150 minutos de irradiação.53
- FIGURA 25: Reações envolvidas na inibição enzimática (método Ellman)...54
- FIGURA 26: Espectro eletrônico UV-Vis da formação do íon TNB no sistema controle $[\text{enzima}] = 0,025 \text{ U mL}^{-1}$, $[\text{substrato}] = 0,1 \text{ M}$54
- FIGURA 27: Cinética para acompanhamento da formação do íon TNB, $[\text{substrato}] = 0,1 \text{ M}$ (a), $0,06 \text{ M}$ (b) e $0,03 \text{ M}$ (c) para o ácido cafeico livre, linha preta = sistema controle, vermelha $20 \mu\text{M}$, azul $40 \mu\text{M}$ e rosa $100 \mu\text{M}$55
- FIGURA 28: Cinética para acompanhamento da formação do íon TNB, $[\text{substrato}] = 0,1 \text{ M}$ (a), $0,06 \text{ M}$ (b) e $0,03 \text{ M}$ (c), para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$, linhas preta = sistema controle, vermelha $20 \mu\text{M}$, azul $40 \mu\text{M}$ e rosa = $100\mu\text{M}$56
- FIGURA 29: Representação da estrutura do radical $\text{DPPH}\cdot$58
- FIGURA 30: Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis do radical $\text{DPPH}\cdot$.58

- FIGURA 31: Espectro de UV-Vis do radical DPPH na presença de diferentes concentrações de (a) ácido cinâmico e (b) complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ 59
- FIGURA 32: Espectro de UV-Vis do radical DPPH na presença de diferentes concentrações de dmaca (a) e complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b). 61
- FIGURA 33: Espectro de UV-Vis do radical DPPH na presença de diferentes concentrações do ligante livre ácido cafeico..... 62
- FIGURA 34: Porcentagem de Inibição do DPPH• frente ao ácido cafeico..... 63
- FIGURA 35: Espectro de UV-Vis do radical DPPH• na presença de diferentes concentrações do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ 64
- FIGURA 36: Proposta de mecanismo para inibição do radical DPPH pelo complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ por transferência de próton..... 66
- FIGURA 37: Espectro de UV-Vis ensaio NBT variando a concentração do ligante ácido cafeico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (b)..... 68
- FIGURA 38: Porcentagem da atividade do ânion superóxido variando a concentração do ligante ácido cafeico (a) e complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (b). 69
- FIGURA 39: Espectro de UV-Vis ensaio NBT variando a concentração do ligante dmaca (a) e complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b). 71
- FIGURA 40: Porcentagem da atividade do ânion superóxido variando a concentração do ligante dmaca (a) e complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b). 72
- FIGURA 41: Espectro de UV-Vis ensaio NBT variando a concentração do ligante ácido cinâmico (a) e complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (b)..... 73

FIGURA 42: Esquema de detecção de oxigênio singlete via técnica de EPR, adaptado.....	74
FIGURA 43: Esquema de geração de oxigênio singlete riboflavina foto excitada.....	75
FIGURA 44: Espectros de EPR do aduto Oxo-TEMPO em variadas concentrações do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (a) e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b).	76
FIGURA 45: Ensaios MTT para estimar a citotoxicidade dos ligantes livres em células de melanoma.	78
FIGURA 46: Ensaios MTT para estimar a citotoxicidade dos complexos em células de melanoma humano.	79

RESUMO

SÍNTESE DE COMPLEXOS DE Mg(II), ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA: O objetivo deste trabalho foi sintetizar complexos de magnésio contendo produtos naturais que apresentem atividade antioxidante para atuarem no setor de cosméticos. Para isso foram sintetizados e caracterizados três complexos metálicos do tipo $[Mg(phen)_2PN]^+$, em que phen representa 1,10-fenantrolina e PN são os produtos naturais: ácido cafeico (caf), ácido cinâmico (cin) e ácido 4-dimetilamino cinâmico (dmaca). As caracterizações dos ligantes e complexos foram realizadas por espectrometria de massas por injeção de elétrons e pelas técnicas espectroscópicas UV-Vis, IV e RMN de 1H . A atividade antioxidante dos compostos foi investigada em relação à transferência de elétrons e de átomo de hidrogênio usando o radical livre (DPPH). Nestes experimentos, somente o ácido cafeico livre e seu complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ apresentaram atividade antioxidante em relação ao DPPH. Um ensaio indireto para determinação da capacidade da superóxido dismutase (SOD) de inibir as reações induzidas pelo ânion radicalar superóxido foi realizado. Pelo método de redução da riboflavina na presença de metionina e induzida pela irradiação com luz de 420 nm, avaliou-se a capacidade antioxidante dos complexos em relação ao radical superóxido. Neste estudo observou-se atividade antioxidante para os compostos fenólicos ácido cafeico (caf) e ácido 4-dimetilamino cinâmico (dmaca), bem como para seus respectivos complexos $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ e $[Mg(phen)_2(dmaca)]^+$, sendo que os maiores percentuais de inibição do $O_2^{\cdot-}$ foram observados nos complexos. A atividade antioxidante em relação ao oxigênio singlete (1O_2) foi realizado utilizando a técnica de ressonância paramagnética (EPR). Para o complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ o valor de IC_{50} foi de $5,0 \mu g mL^{-1}$ e para o $[Mg(phen)_2(dmaca)]^+$ o valor de IC_{50} foi de $7,5 \mu g mL^{-1}$. Os complexos não inibiram a atividade da enzima acetilcolinesterase. Ensaio MTT para estimar a citotoxicidade dos complexos em células de melanoma humano A375 indicaram valores e IC_{50} ao redor $6 \mu M$ para os três complexos estudados.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF Mg(II) COMPLEXES, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY : The objective of this work was to develop metal complexes containing natural products that have antioxidant activity to be applied in the cosmetics sector. For that, 3 $[\text{Mg}(\text{phen})_2\text{PN}]^+$ metal complexes were synthesized and characterized, where phen = 1,10-phenanthroline and PN are the natural products: caffeic acid (caf), cinnamic (cin) and cinnamic 4-dimethylamino acid (dmaca). The characterizations of ligands and complexes were carried out by electron injection mass spectrometry, UV-Vis, infrared, and ^1H NMR spectroscopic techniques. The antioxidant activity of the compounds was investigated in relation to electron and hydrogen atom transfer using the free radical DPPH. In these experiments, only free caffeic acid and its $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ complex showed antioxidant activity in relation to DPPH. An indirect test to determine the ability of superoxide dismutase (SOD) to inhibit the reactions induced by the superoxide radical anion was performed. Using the riboflavin reduction method in the presence of methionine and induced by 420 nm light irradiation, the antioxidant capacity of the complexes in relation to the superoxide radical was evaluated. In this study, antioxidant activity was observed for the phenolic compounds caffeic acid (caf) and cinnamic 4-dimethylamino acid (dmaca), as well as for their respective $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ and $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ complexes, with the highest inhibition percentages of O_2^- were observed for the complexes. The antioxidant activity in relation to singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) was performed using the paramagnetic resonance (EPR) technique. For the $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ complex the IC_{50} value was $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ and for the $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ the IC_{50} value was $7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. The complexes did not inhibit the activity of the enzyme acetylcholinesterase. MTT assays to estimate the cytotoxicity of complexes in A375 human melanoma cells indicated IC_{50} around $6 \mu\text{M}$ for the 3 complexes studied.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Envelhecimento da pele	1
1.2	Espécies reativas do Oxigênio	3
1.3	Sistemas de Defesa Antioxidante.....	6
1.4	Estresse Oxidativo.....	8
1.5	Antioxidantes e Fotoenvelhecimento.....	8
1.6	Fotoprotetores.....	9
1.7	Química do magnésio.....	10
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Reagentes	14
3.2	Preparação dos complexos	15
3.2.1	Síntese do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$	15
3.2.2	Síntese do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$	15
3.2.3	Síntese do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$	16

3.3 Equipamentos e Metodologia.....	17
3.3.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	17
3.3.2 Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis.....	17
3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	17
3.3.4 Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase ECh(E.e).....	18
3.3.5 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH•).....	18
3.3.6 Atividade sequestradora do radical ânion superóxido (O_2^-).....	19
3.3.7 Desativação de oxigênio singlete.....	20
3.3.8 Cultura das células.....	20
3.3.9 Ensaio de citotoxicidade.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Infravermelho.....	23
4.2 Caracterização por RMN.....	26
4.2.1 Complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$	26
4.2.2 Complexo $[Mg(phen)_2(cin)]^+$	28
4.2.3 Complexo $[Mg(phen)_2(dmaca)]^+$	30
4.3 Caracterização por espectrometria de massas.....	32
4.4 RMN DOSY 1H	38

4.5	Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis	41
4.6	Luminescência em diferentes valores de pH.....	43
4.7	Eletroquímica	45
4.8	Estabilidade fotoquímica.....	51
4.9	Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase EAC _h (E.e)	53
4.10	Atividade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH•	57
4.11	Atividade sequestradora de radicais O ₂ ^{•-}	67
4.12	Desativação de oxigênio singlete.....	74
4.13	Citotoxicidade	78
5	CONCLUSÃO	80
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, consistindo em várias camadas, incluindo a epiderme e a derme. Essas camadas formam uma barreira protetora contra as condições ambientais, como calor, infecção, atividade oxidativa e perda de água¹.

Mesmo assim, a pele sofre os efeitos do envelhecimento que é considerado um processo complexo, e várias propostas surgiram para ajudar a explicá-lo². Por exemplo, enquanto o envelhecimento cronológico é predeterminado pelas pré-disposições fisiológicas do indivíduo, o fotoenvelhecimento depende principalmente do nível de exposição a luz solar e a quantidade de melanina na pele. Indivíduos que têm histórico de exposição à luz solar intensa, ou seja, que vivem em áreas geográficas ensolaradas e tem pele clara estão mais expostos a radiação ultravioleta (UVR) e, conseqüentemente, a um fotoenvelhecimento grave³.

Os sinais clínicos do fotoenvelhecimento incluem rugas, pigmentação (hipo- ou hiper-pigmentação), pele aspera, perda do tom da pele, secura, sulcos profundos, atrofia grave, lesões pré-cancerosas, câncer de pele e melanoma⁴. O melanoma é um tipo de câncer de pele, derivado de células melanocíticas, mas que pode acometer outros locais do corpo como mucosas e vísceras. A pele de qualquer parte do corpo pode apresentar o desenvolvimento do melanoma, como palmas das mãos, unhas e sola dos pés. Entretanto, o melanoma é mais comum no tronco (especialmente nos homens), nas pernas (especialmente nas mulheres), no pescoço e no rosto, locais onde mais sofrem as conseqüências da radiação solar^{5,6}. Apesar de representar apenas 4 % dos casos de câncer de

pele, o melanoma é responsável por cerca de 90 % das mortes relacionadas ao câncer de pele. Isso porque o melanoma é um câncer agressivo que tende a se espalhar rapidamente para outras partes do corpo em um processo chamado metástase. No entanto, se descoberto em estágio inicial, o melanoma é quase sempre curável.

O sol é a principal fonte de radiação ultravioleta (UVR) e o principal contribuinte para o fotoenvelhecimento. A radiação UVC (100 a 290 nm) é praticamente absorvida pela camada de ozônio e não afeta a pele. UVB (290 a 320 nm) afeta a camada superficial da pele (epiderme) e provoca queimaduras solares. É a mais intensa entre as 10 h e as 14 h, durante o verão, e contabiliza por volta de 70 % da dose cumulativa média anual de UVB de uma pessoa. Para causar o mesmo nível de danos a pele são necessários um maior número de fótons UVA (320 a 400 nm) que de UVB visto que são menos energéticos, mas são mais penetrantes⁷.

A exposição dos indivíduos a radiação UV ambiental e artificial aumentou significativamente nos últimos 50 anos. Isto por causa do aumento da energia solar UV como consequência da destruição do ozônio estratosférico, pouco uso de protetores solares, atividades de lazer ao ar livre e ao aumento da expectativa de vida nos países industrializados.

Entre estes muitos estudos, a teoria das manifestações celulares do envelhecimento propõe que as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas nas células são os responsáveis pelo envelhecimento⁸. Isto pode ocorrer por exemplo pela absorção de luz UV pela epiderme⁹. Os mecanismos moleculares do efeito prejudicial da radiação IVA na pele são atribuídos a indução da matriz

de metaloproteinase 1, bem como para geração de espécies reativas de oxigênio (ERO).

As ERO são subprodutos da respiração aeróbica que estão envolvidos na modificação de múltiplas reações celulares. Elas também são produzidas pelas respostas celulares a inflamação, privação de nutrientes, radiação ionizante, luz ultravioleta (UV), hipóxia e exposição a metais pesados e oxidantes.

As células estão preparadas para lidar com as ERO com um número substancial de antioxidantes (por exemplo, vitamina C, vitamina E, glutathione reduzida e carotenóides), bem como com o sistema de defesa antioxidante natural que inclui superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR)¹⁰.

A geração excessiva de ERO pode causar morte celular por apoptose ou necrose. Esses processos levam a alterações celulares que são observadas durante a diferenciação, envelhecimento e transformação maligna além de dificultar a regeneração celular nos casos de feridas e cortes nos tecidos¹¹⁻¹³.

Durante essas alterações, ERO e radicais livres influenciam a expressão de vários genes e vias de transdução de sinal. Os efeitos mais significativos são observados na proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)/proteína ativadora-1 (AP-1)¹⁴ e vias de sinalização de ativação de metaloproteinase de matriz (MMP)¹⁵.

1.2 Espécies reativas do Oxigênio

Energia é essencial para a manutenção da vida, por esse motivo, durante o processo evolutivo os organismos vivos, a fim de sobreviverem em uma atmosfera rica em oxigênio, desenvolveram células específicas capazes de

produzir energia química pelo consumo de oxigênio atmosférico. Esse processo aumentou significativamente o rendimento energético permitindo a reprodução e propiciando a evolução das espécies^{16,17}. O elo essencial entre as vias de produção e consumo de energia nos organismos aeróbicos é o nucleotídeo trifosforilado adenosina 5'-trifosfato, ATP¹⁷.

Na respiração, o oxigênio é consumido junto com os substratos metabólicos, enquanto o ATP, água e CO₂ são produzidos. Esse processo que ocorre na etapa final da cadeia respiratória mitocondrial, envolve a redução do oxigênio por 4 elétrons para a formação da água. O oxigênio com dois elétrons desemparelhados e de spins iguais, para ser reduzido necessita receber seus elétrons um a um¹⁸⁻²². Essa redução é realizada pela enzima citocromo c oxidase, e envolve 4 etapas de 1 e⁻ com a formação sequencial das 3 espécies reativas do oxigênio: anion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila livre (OH[•]), FIGURA 1. Embora o processo oxidativo nas células geralmente resulte na redução quase que simultânea do oxigênio por 4 e⁻, sem a liberação de intermediários, a formação de ERO's é inevitável, principalmente em decorrência do vazamento de elétrons da cadeia respiratória e reação com o oxigênio. Vale ressaltar que o interior de uma célula é um ambiente redutor, e muitas das componentes celulares são capazes de reagir diretamente com o oxigênio competindo com as enzimas que controlam e direcionam as reações benéficas do oxigênio. Estima-se que de 2 % a 5 % do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos por 1 e⁻ formando o radical superóxido. Iniciando assim, a formação das espécies reativas do oxigênio^{16,17,23-31}.

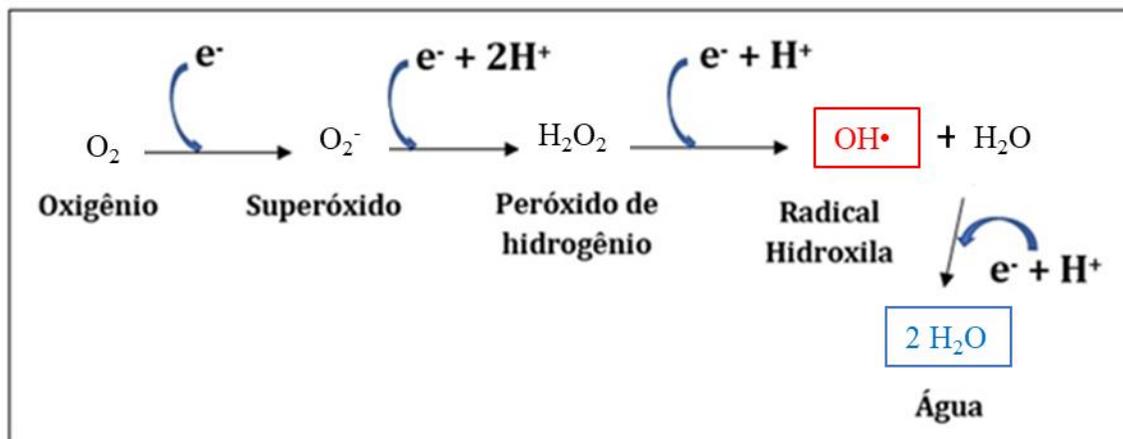


FIGURA 1: Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando a formação das espécies reativas do oxigênio: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.

Como os radicais livres são espécies extremamente instáveis, eles podem atacar alvos celulares diversos para serem estabilizados. A consequência disso é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e sub-celulares, DNA e proteínas que prejudicam o metabolismo intracelular e provocam a morte celular¹⁸⁻²².

Entre as espécies reativas do oxigênio, o radical hidroxila é o que causa maior dano celular, uma vez que pode reagir com o carbono alfa de qualquer aminoácido, danificando as funções biológicas de qualquer molécula na sua vizinhança incluindo DNA, proteínas e lipídeos^{18-22,32-34}.

O radical hidroxila é produzido por pelo menos quatro mecanismos *in vivo*: fissão da água por radiação ionizante; redução do peróxido de hidrogênio por íons metálicos reduzidos (Fe^{2+} , Cu^+) nas reações de Fenton; reação do hipoclorito (HOCl) com oxigênio e pela decomposição do peroxonitrito (ONO_2^-)^{18-22,32-34}.

O radical superóxido é uma molécula hidrofílica. Por isso, para passar pela membrana celular depende das células eritrocíticas e trombóticas. Esse radical é capaz de reduzir íons metálicos oxidados no interior da célula, promovendo a reação de Fenton. Apesar de não ser muito reativo, pode difundir-se no meio biológico antes de encontrar seu alvo crítico. Isso faz com que os danos potenciais causados por este radical no meio biológico tenham a mesma extensão prevista para o radical hidroxila.

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre mas é convertido pelas reações de Fenton ou de Haber-Weiss no radical hidroxila na presença de Fe^{2+} ou de Cu^+ , que são abundantes nas células, equações 1, 2 e 3^{18-22,32-34}.

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



1.3 Sistemas de Defesa Antioxidante

Apesar dos efeitos deletérios do oxigênio, a vida aeróbica tornou-se possível graças às adaptações biológicas durante o processo evolutivo. Essas adaptações levaram ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante contra a toxicidade do oxigênio no interior das células^{35,36}. Tais mecanismos são divididos em duas grandes classes: (1) enzimáticos e (2) não enzimáticos. Os dois sistemas atuam no sentido de impedir os efeitos deletérios causados pelas espécies reativas do oxigênio nas células. O sistema de defesa enzimático tanto

celular como de tecido é constituído pelas enzimas: superóxido dismutase Mn-SOD; Cu/Zn-SOD e EC-SOD (extra-celular); glutaciona peroxidase (GPX)/ glutaciona redutase (GR) e catalase (CAT). A função da enzima SOD é diminuir os níveis de superóxido nas células, enquanto as enzimas catalase e peroxidase fazem o mesmo com o peróxido de hidrogênio, FIGURA 2(b) e (c).

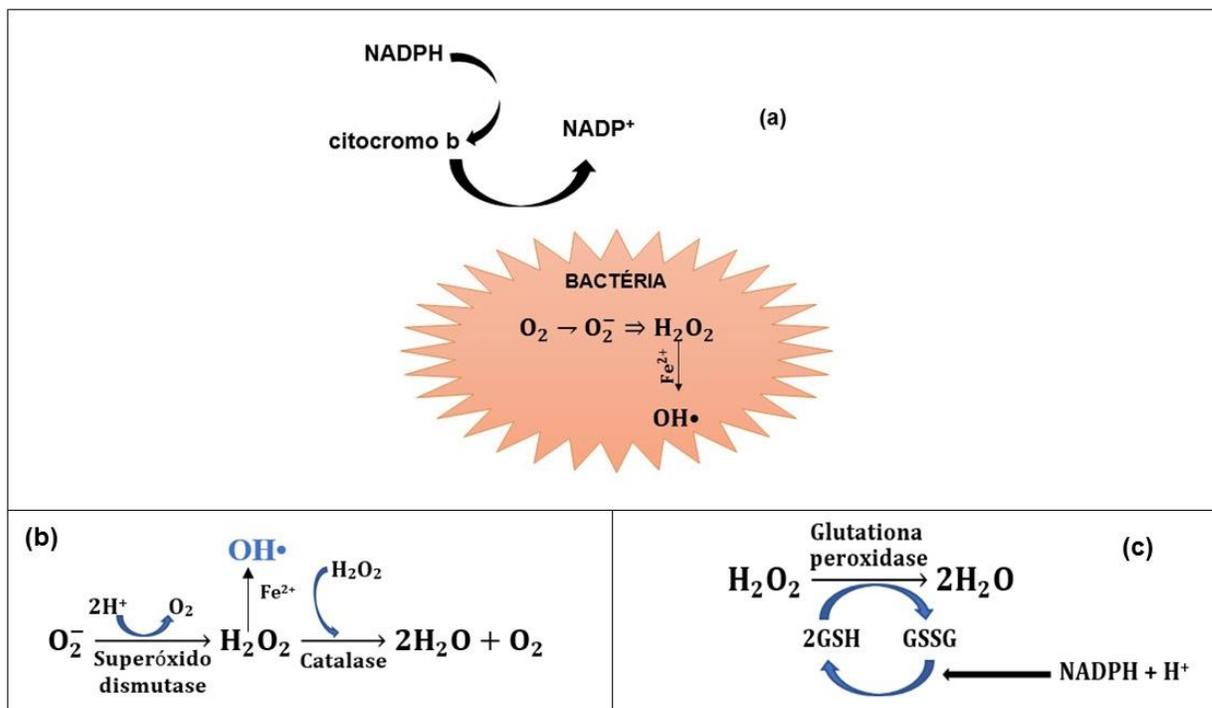


FIGURA 2: Explosão respiratório (ou burst respiratório) em fagócitos (a). Remoção catalítica de ERO's pelas enzimas antioxidantes (b) e (c).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático é constituído por moléculas pequenas que atuam na detoxificação das ERO's, dando seus elétrons e/ou prótons para as moléculas dos radicais livres formados, sem, no entanto, transformarem-se em radicais reativos³⁷. Entre elas encontram-se as vitaminas A (β -caroteno), E (α -tocoferol) e C (ácido ascórbico) e de forma muito importante polifenóis e a glutaciona (GSH).

As vitaminas atuam de forma conjunta e em diferentes regiões intracelulares com características lipossolúveis. As vitaminas A e E estão localizadas no interior das membranas celulares, enquanto a vitamina C por ser hidrossolúvel atua no citosol, participando também na re-oxidação das vitaminas lipossolúveis³⁷.

1.4 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigênio, podendo ocorrer tanto pelo aumento na formação destas espécies, quanto pela queda na capacidade antioxidante celular³⁸. Esse processo oxidativo pode levar a perda das funções celulares. Para a proteção da célula, ocorre um aumento na produção de antioxidantes naturais dela.

Apesar das defesas antioxidantes endógenas serem eficientes, não são infalíveis, e constantemente há formação de espécies reativas de oxigênio, bem como de nitrogênio que interagem em diferentes níveis com o ambiente celular antes de serem eliminadas.

1.5 Antioxidantes e Fotoenvelhecimento

Recentemente, extratos vegetais, resíduos agronômicos e culturas de células vegetais vem sendo utilizados em cosméticos. Vários estudos demonstram que os recursos biológicos (por exemplo, frutas e legumes) podem efetivamente reduzir os riscos de doenças de pele. Curiosamente, inúmeros estudos têm se concentrado nos efeitos dérmicos benéficos dos recursos vegetais da dieta, devido às suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias na pele³⁹⁻⁴³.

As frutas cítricas são uma das frutas mais populares e amplamente utilizadas para barras de frutas, sucos, tortas, sorvetes e geléias em todo o mundo, pois podem ser uma excelente fonte alimentar de substâncias benéficas. Além de conter muitos nutrientes e possuir um teor de gordura muito baixo. Especificamente, os ácidos orgânicos das frutas cítricas, como o ácido cítrico e ácido málico são facilmente metabolizados e são componentes-chave de muitas vias metabólicas em humanos.

Recentemente, extratos vegetais, resíduos agronômicos e culturas de células vegetais vem sendo utilizados em cosméticos⁴⁰⁻⁴³.

Diversos estudos demonstraram que frutas cítricas, frutas cítricas extratos e flavonóides cítricos têm um efeito preventivo sobre a geração de ERO, inflamação incidência de câncer e várias doenças crônicas⁴⁴⁻⁴⁶.

Evidências recentes indicam que substâncias presentes no chá verde, em *berries* (em particular mirtilo e *blueberries*) e em vinho tinto podem também proteger contra os danos oxidativos causados pelas ERO^{47,48}.

Apesar da importância de muitos produtos naturais no estresse oxidativo ser reconhecida, a atividade *in vivo* desses compostos é difícil de ser demonstrada em decorrência da baixa biodisponibilidade e acúmulo na região gastrointestinal⁴⁹⁻⁵¹. Isso por sua vez, é em grande parte consequência da sua elevada susceptibilidade para modificações metabólicas.

1.6 Fotoprotetores

Para prevenir as alterações danosas do DNA, surgimento de câncer e envelhecimento da pele, a proteção contra a radiação solar é essencial, especialmente nas pessoas mais expostas a luz solar. Essa prevenção inclui a

diminuição da exposição ao sol (sempre que possível), uso de roupa adequada e utilização de filtros solares. Um protetor solar deve ter um amplo espectro de ação contra a radiação UV, absorvendo em várias regiões – tais como UVA e UVB⁵².

Os organismos vivos contêm vários cromóforos, ou seja, as substâncias que tem capacidade de absorver a energia da luz UV, como ácidos nucleicos, proteínas e outras moléculas específicas para esta defesa, como melanina, nos humanos. No caso das plantas, os compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides, que inspiram a obtenção dos filtros solares sintéticos. A maioria destes compostos, absorvem a luz entre comprimento de onda 280 a 320 nm e, por causa disso, são atenuadores de UVB^{52,53}.

As pesquisas de novas moléculas fotoestáveis para utilização em protetores solares ainda são extensivamente realizadas, sendo que atualmente se destaca um interesse crescente para o desenvolvimento de filtros baseados em produtos naturais. A escolha de novos ativos envolve principalmente a capacidade de absorção da luz UV pelos cromóforos de cada molécula, associada à possível atividade antioxidante. E diversos produtos naturais tem sido relatado como potenciais agentes com atividades antioxidantes como por exemplo, os compostos fenólicos, os derivados do ácido caféico, ácido cinâmico, lignanas e flavonóides⁵⁴.

1.7 Química do magnésio

O magnésio é um elemento essencial no sistema biológico; participando do metabolismo de carboidratos e lipídeos. É também um cofator essencial de muitas enzimas envolvidas na síntese do ATP, o que o coloca numa relação direta com o estresse oxidativo. Por exemplo, estudos *in vivo* com cobaias

demonstraram que a presença de Mg evita a produção de radicais livres de oxigênio no cérebro e inibem os efeitos de superóxido nas células de útero humano. Além disso, os complexos de Mg (II) são bons modelos para o desenvolvimento de carreadores de compostos fenólicos uma vez que este íon metálico reage com facilidade com ligantes doadores de O e N produzindo compostos estáveis e que podem levar a um composto solúvel em água. O íon Mg (II) com 8 elétrons na camada de valência externa é um íon metálico estável. Isto impede sua participação direta em reações redox que podem levar a formação das espécies reativas do oxigênio como ocorre com os íons de metais de transição Fe, Cu, V, Co, os quais em geral atuam tanto como antioxidantes, quanto pró-oxidantes⁵⁵⁻⁵⁷.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de complexos metálicos coordenados a moléculas bioativas com interesse no tratamento de doenças neurodegenerativas^{49-51,58-61}. Por exemplo o complexo *cis*-[Mg(phen)(hesp)₂], preparado no nosso laboratório, apresenta propriedades físico-químicas, e biológicas que os colocam como potenciais candidatos a aplicação terapêutica⁵⁸⁻⁶¹. Estudos preliminares da atividade sequestradora do radical superóxido (IC₅₀ = 68,3 μmol L⁻¹ a pH 7,8) levaram a um resultado superior a hesperidina livre (IC₅₀ = 116,68 μmol L⁻¹) e vitamina C (IC₅₀ = 852 μmol L⁻¹).

Nossos resultados demonstram também, que componentes estruturais específicas são fundamentais para uma melhor atividade antioxidante. Vale ressaltar que a escolha do centro metálico para a coordenação do flavonóide é também essencial para uma melhora na atividade biológica.

Estes resultados nos motivaram a dar continuidade a estes estudos fazendo uma avaliação mais intensiva das propriedades antioxidantes destes complexos visando o setor de cosméticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar complexos de magnésio contendo produtos naturais que apresentem atividade antioxidante para atuarem no setor de cosméticos.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar os complexos $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$, $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$;
- Caracterizar os complexos obtidos pelas técnicas de IV, UV-Vis, RMN ^1H ;
- Avaliar a estabilidade dos complexos em solução aquosa;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos complexos;
- Avaliar a citotoxicidade dos complexos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os compostos 1,10-fenantrolina (phen), nitrato de magnésio hexa hidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ácido cafeico, ácido cinâmico e ácido 4-dimetilamino cinâmico de procedência Sigma-Aldrich, foram utilizados como reagentes nas sínteses dos complexos. O preparo das soluções tampões foram utilizados ácido fosfórico (H_3PO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4), todos de procedência Sigma-Aldrich.

Os compostos 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), L-metionina, riboflavina e nitroazul tetrazólio (NBT) foram utilizados na avaliação da capacidade antioxidante.

Os solventes orgânicos usados são de grau de pureza HPLC e as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q.

3.2 Preparação dos complexos

3.2.1 Síntese do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$

As sínteses dos complexos foram realizadas de maneira similar ao procedimento descrito na literatura^{4,62}. A um balão de 3 bocas de 100 mL adicionou-se $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (513 mg, 2,0 mmol), 1,10-fenantrolina (378 mg, 2,1 mmol), ácido cafeico (378 mg, 2,1 mmol) e 2,1 mmol de trietilamina (TEA) foram solubilizados em 15 mL de metanol utilizado para solubilizar os reagentes, foi previamente desaerado em atmosfera inerte de nitrogênio por 10 minutos, afim de evitar algum tipo de oxidação em atmosfera de oxigênio. A mistura reacional foi mantida em refluxo por duas horas sob atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência de luz. Após esse período, deixou-se em repouso até atingir a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Filtrou-se e rotaevaporou-se o líquido até um volume de 3 mL. Em seguida, adicionou-se 10 mL de água gelada e colocou-se no congelador por aproximadamente 20 minutos a fim de se obter a maior quantidade possível do precipitado. Por fim, filtrou-se a vácuo o sólido, obtendo-se 0,765 g do complexo.

3.2.2 Síntese do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$

O complexo foi preparado utilizando $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,026 g, 4 mmol), 1,10-fenantrolina (756 mg, 4,2 mmol), ácido cinâmico (622 mg, 4,2 mmol) e 4,2 mmol de trietilamina (TEA), solubilizados em 15 mL de metanol previamente desaerado. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por duas horas sob atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência de luz. Após esse período, deixou-se resfriando até atingir a temperatura ambiente (25 ± 1

°C). Posteriormente, a solução foi filtrada e rotaevaporada até um volume próximo a 5 mL, adicionou-se 15 mL de água gelada e houve a formação de um precipitado. Filtrou-se o sólido a vácuo e obteve-se 1,137 g do complexo.

3.2.3 Síntese do complexo [Mg(phen)₂(dmaca)]⁺

O complexo foi preparado utilizando Mg(NO₃)₂.6H₂O (1,026 g, 4 mmol), 1,10-fenantrolina (756 mg, 4,2 mmol), ácido 4-dimetilamino cinâmico (803 mg, 4,2 mmol) e 4,2 mmol de trietilamina (TEA), solubilizados em 15 mL de metanol previamente desaerado. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por duas horas sob atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência de luz. Após esse período, deixou-se resfriando até atingir a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Posteriormente, filtrou-se e rotaevaporou-se a solução até um volume próximo a 5 mL. Adicionou-se 15 mL de água gelada, obtendo-se instantaneamente um precipitado. Filtrou-se o sólido a vácuo e obteve-se 1,170 g do complexo.

3.3 Equipamentos e Metodologia

3.3.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no estado sólido utilizando-se um espectrofotômetro SHIMADZU com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21 na região compreendida entre 4000 e 200 cm^{-1} . As amostras no estado sólido foram diluídas em KBr, mantida em estufa a 120 °C, na proporção 1/100 (amostra/KBr).

3.3.2 Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) utilizando-se um espectrofotômetro Agilent 8453A.

3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz pertencentes ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.4 Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase EACh(E.e)

A atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase *Electrophorus electricus*, EACh(E.e), foi realizada para o complexo Mg(phen)₂caf e o ligante livre ácido cafeico. Os ensaios foram realizados à 25 °C por espectrofotometria na região do UV-Vis, de acordo com o método de Ellman modificado⁶³. A mistura reacional possui um volume final de 3 mL contendo 50 mM Tris/HCl (solução tampão, pH 8,0), 0,025 unidades de acetilcolinesterase de *E. electricus*, 0,10 mM de iodeto de acetiltiocolina e 333 µM de DTNB. Curvas de inibição foram realizadas com incubação de pelo menos 4 concentrações do composto por 15 minutos. Devido à baixa solubilidade do ligante e complexo em água, eles foram solubilizados em 200 µL de DMSO.

3.3.5 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH•)

Preparou-se 0,1 mM de DPPH• em etanol e o analito em várias concentrações (5 µg mL⁻¹ – 20 µg mL⁻¹). Em uma solução de 1,5 mL de etanol foi adicionado 0,15 mL da solução DPPH• e 0,25 mL do analito. Após 45 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizado a leitura da absorbância no comprimento de onda de 515 nm.

A capacidade de eliminação do radical DPPH• foi então calculada utilizando a seguinte equação 4:

$$\% \text{ inibição DPPH}\bullet = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100] \quad 4$$

Em que A_{controle} é a absorbância da reação de controle e A_{amostra} é a absorbância na presença do analito em estudo.

3.3.6 Atividade sequestradora do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

As soluções de MET, Rib e NBT foram preparadas em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) ao abrigo da luz. Os compostos pouco solúveis em água foram previamente dissolvidos em 200 μ L de DMSO. Nesta metodologia, o radical superóxido foi gerado em 3,0 mL contendo MET (10×10^{-3} mol L^{-1}), NBT ($4,6 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}), Rib ($3,3 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}) e os compostos testados em diferentes concentrações (1 – 8 μ g mL^{-1})⁶⁰.

Após incubação à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e irradiado durante 7 minutos por duas lâmpadas fluorescentes de 420 nm, a absorbância (A_i) das amostras foi medida no espectrofotômetro UV-Vis em 560 nm. A amostra sem o composto testado e guardada ao abrigo da luz foi utilizada como controle. A porcentagem de inibição do radical superóxido foi calculada a partir da seguinte equação 5.

$$\% \text{ inibição } O_2^{\cdot-} = [(A_0 - A_i/A_0) \times 100] \quad 5$$

Onde A_i é a absorbância na presença do composto testado e A_0 é a absorbância na ausência do composto testado.

3.3.7 Desativação de oxigênio singleto

O oxigênio Singleto $^1\text{O}_2$ é gerado pela exposição da riboflavina à luz monocromática de 420 nm em solução aquosa^{24,30} e sua formação é confirmada pela técnica de EPR (Espectroscopia de Ressonância Paramagnética) utilizando TEMP como *spin trap* para a detecção do radical estável formado^{25,26,28,29,31}. Soluções de riboflavina e dos complexos foram preparadas em água Milli-Q. O oxigênio singleto foi gerado em 2,0 mL de água destilada contendo TEMP (100 mmol L⁻¹), riboflavina ($2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e o complexo de Mg variando as concentrações de 3,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ até 14,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram irradiadas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 30 min em cubetas.

3.3.8 Cultura das células

Células de melanoma humano (A375) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*), uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Essas células foram suplementadas com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de penicilina/estreptomicina. As células foram armazenadas à 37 °C em uma incubadora húmida contendo 5 % de CO₂. Para separar as células do frasco utilizou-se solução de tripsina/EDTA.

3.3.9 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pelo ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Esta é uma técnica colorimétrica que utiliza o metabolismo das células saudáveis para avaliar a viabilidade celular, ou seja, o quanto de células vivas restaram no final do experimento em cada poço. Para isso, utiliza-se um sal de coloração amarela conhecido como MTT, que ao entrar em contato com a enzima redutimétrica NADH produzida por células saudáveis, é reduzido metabolicamente para formar um segundo sal, FIGURA 3, de coloração violeta ($\lambda_{\text{máx}} = 560 \text{ nm}$), conhecido como formazan [E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan].

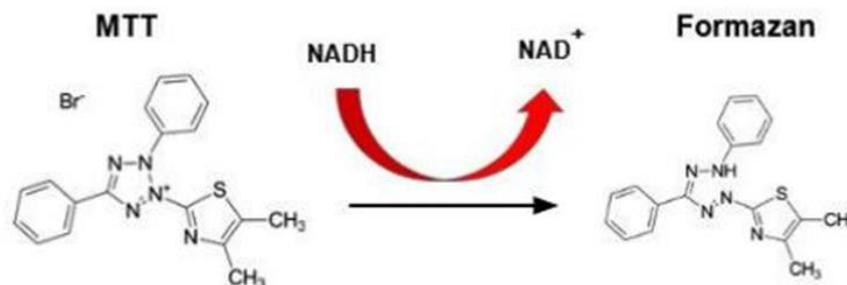


FIGURA 3: Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan.

Este sal violeta é insolúvel em soluções aquosas, mas pode ser facilmente solubilizado em solventes orgânicos resultando em uma solução cuja absorbância é proporcional ao número de células viáveis⁶⁴. Portanto, após o período de incubação, o meio de cultura é descartado, as células foram lavadas com PBS e 0,5 mg mL⁻¹ de solução MTT é adicionada. A incubação continuou

durante 3 h a 37 °C sob uma atmosfera de 5 % de CO₂. Os cristais formados foram solubilizados em 100 µL de DMSO e as placas foram levados a um leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) ou leitor de microplacas para medida da absorbância em 570 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Infravermelho

Os espectros vibracionais no infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr para os ligantes livres e na forma complexada. Para todos os complexos pode-se observar pelo IV que o pico da carbonila em torno de 1650 cm^{-1} , é deslocado para menores frequências. Este deslocamento observado confirma que o grupo C=O perde suas características originais devido a coordenação ao centro metálico de om o Mg (II). O carboxilato possui carga negativa em ambos os oxigênios, já desprotonado, portanto essa ligação C=O já possui uma característica entre simples e ligação dupla, e ao quelar com o Mg (II) ocorre uma diminuição da densidade eletrônica desse oxigênio, fazendo com que observe-se uma diminuição da frequência.

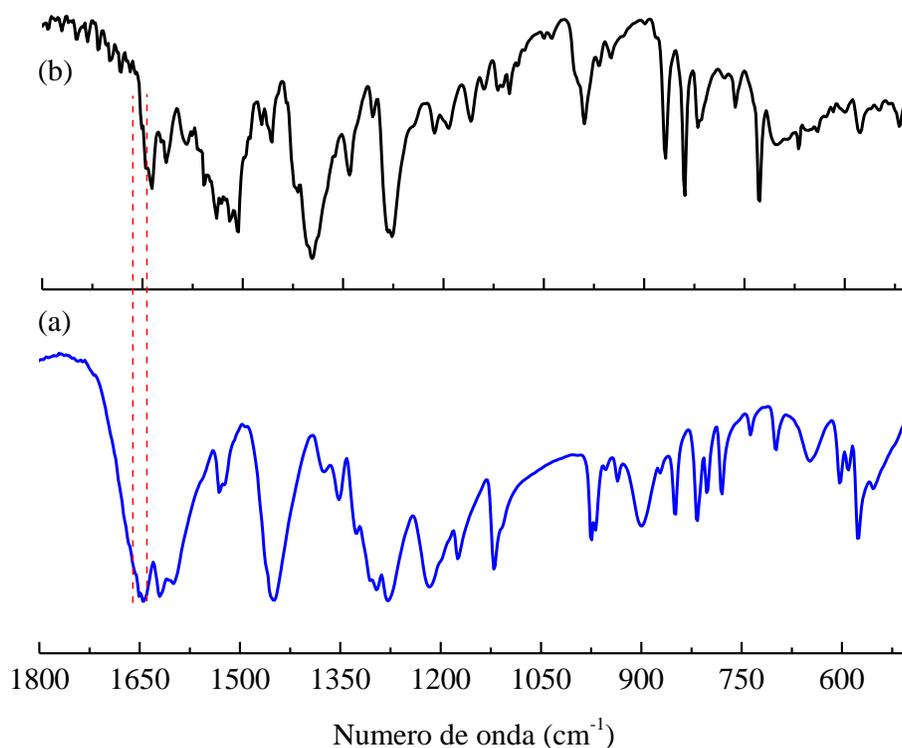


FIGURA 4: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante ácido cafeico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (b) obtido em pastilha de KBr.

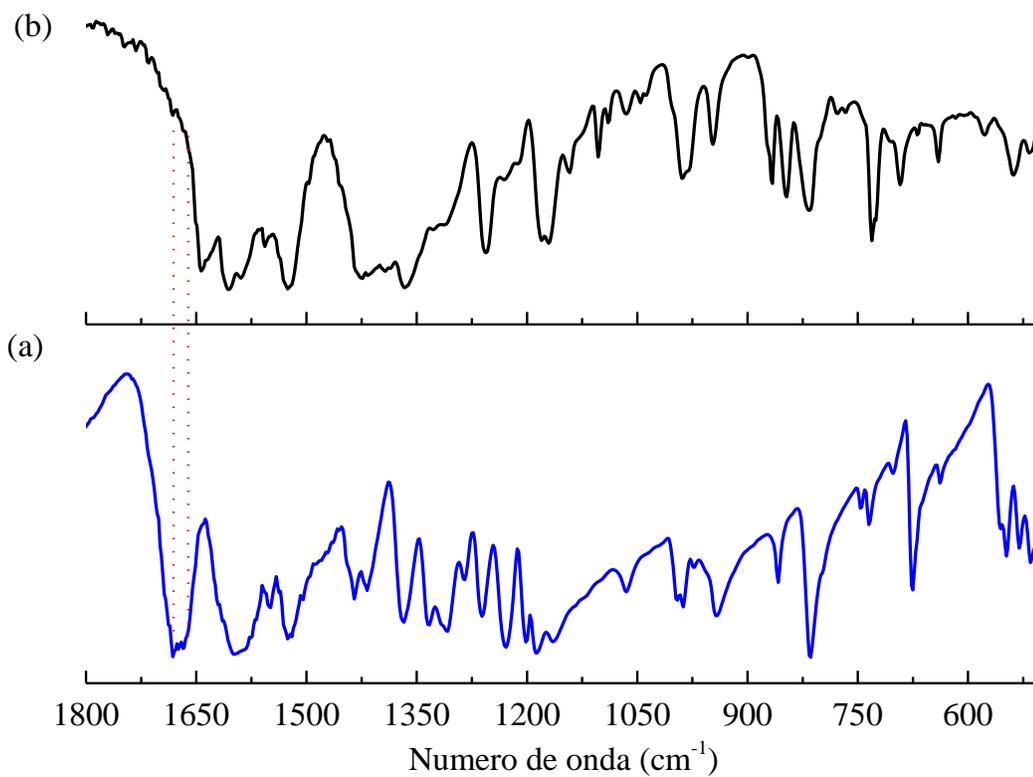


FIGURA 5: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante ácido dmaca (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b) obtido em pastilha de KBr.

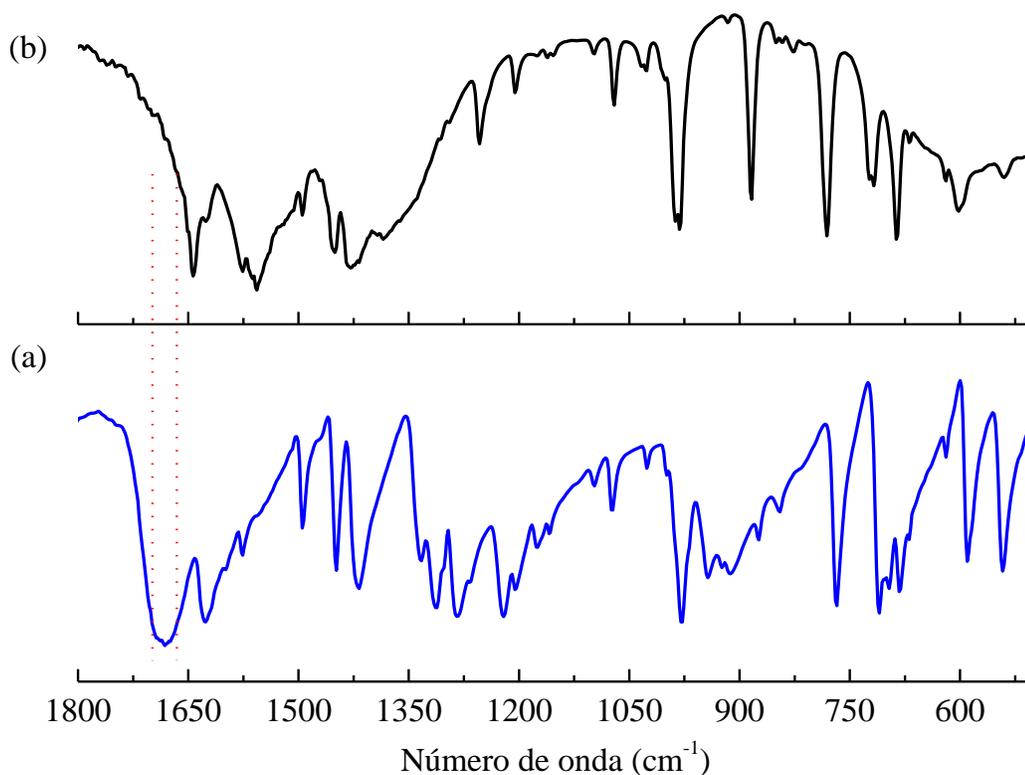


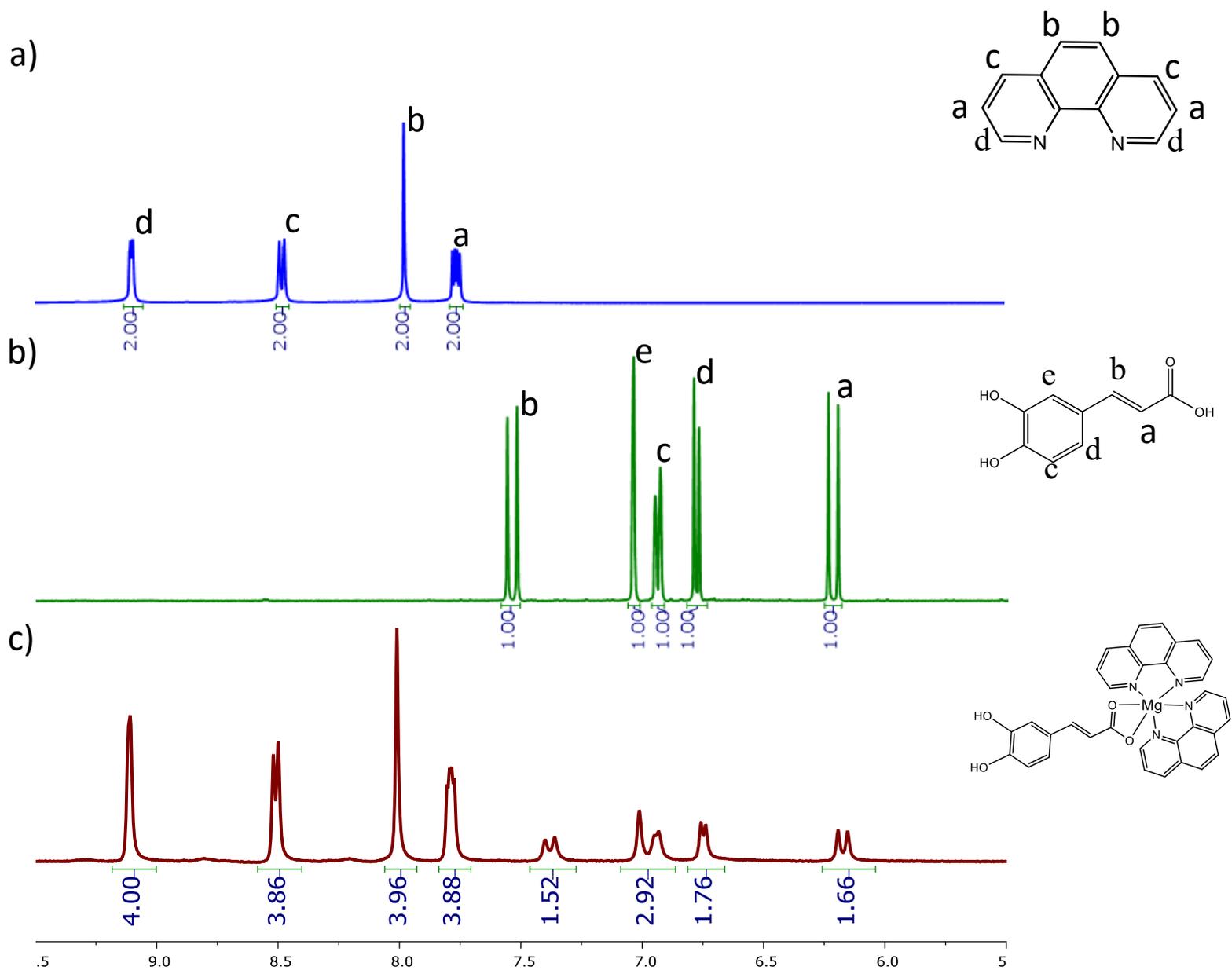
FIGURA 6: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante ácido cinâmico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (b) obtido em pastilha de KBr.

Nos espectros de IV para os ligantes *dmaca* e *cin*, FIGURA 5(a) e FIGURA 6(a) respectivamente, o modo vibracional do estiramento C=O dos ligantes livres aparecem em 1679 cm^{-1} e 1681 cm^{-1} respectivamente. Ao formar os respectivos complexos $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$, a complexação por meio da ligação Mg-O no grupo carboxílico leva ao deslocamento para menores frequências como indicado nas FIGURA 5(b) e FIGURA 6(b), onde observamos os estiramentos do grupo C=O em 1643 cm^{-1} para ambos os complexos.

4.2 Caracterização por RMN

4.2.1 Complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$

Os espectros de RMN de ^1H para os ligantes 1,10-fenantrolina, ácido cafeico e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ obtidos em DMSO-d_6 estão apresentados na FIGURA 7. Os sinais referentes à 1,10-fenantrolina encontram-se na região entre 7,7 e 9,2 ppm, e os sinais referentes ao ácido cafeico estão na faixa entre 6,1 e 7,5 ppm, além de dois sinais entre 9,2 e 9,6 ppm. O espectro de RMN de ^1H do complexo formado apresenta sinais alargados em regiões próximas as dos ligantes livres sugerindo a coordenação dos ligantes ao centro metálico.



4.2.2 Complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$

Os espectros de RMN de ^1H para os ligantes 1,10-fenantrolina e ácido cinâmico e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ obtidos em DMSO-d_6 são apresentados na FIGURA 8

FIGURA 8. Os sinais referentes à 1,10-fenantrolina encontram-se na região entre 7,7 e 9,2 ppm, e os sinais referentes ao ácido cinâmico estão na faixa entre 6,4 e 7,8 ppm. Como observado no espectro de RMN de ^1H para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ o espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ apresenta alargamento de sinal e devido a isto não foi possível atribuir uma estrutura para o complexo formado entre os ligantes 1,10-fenantrolina, o ácido cinâmico e o centro metálico magnésio.

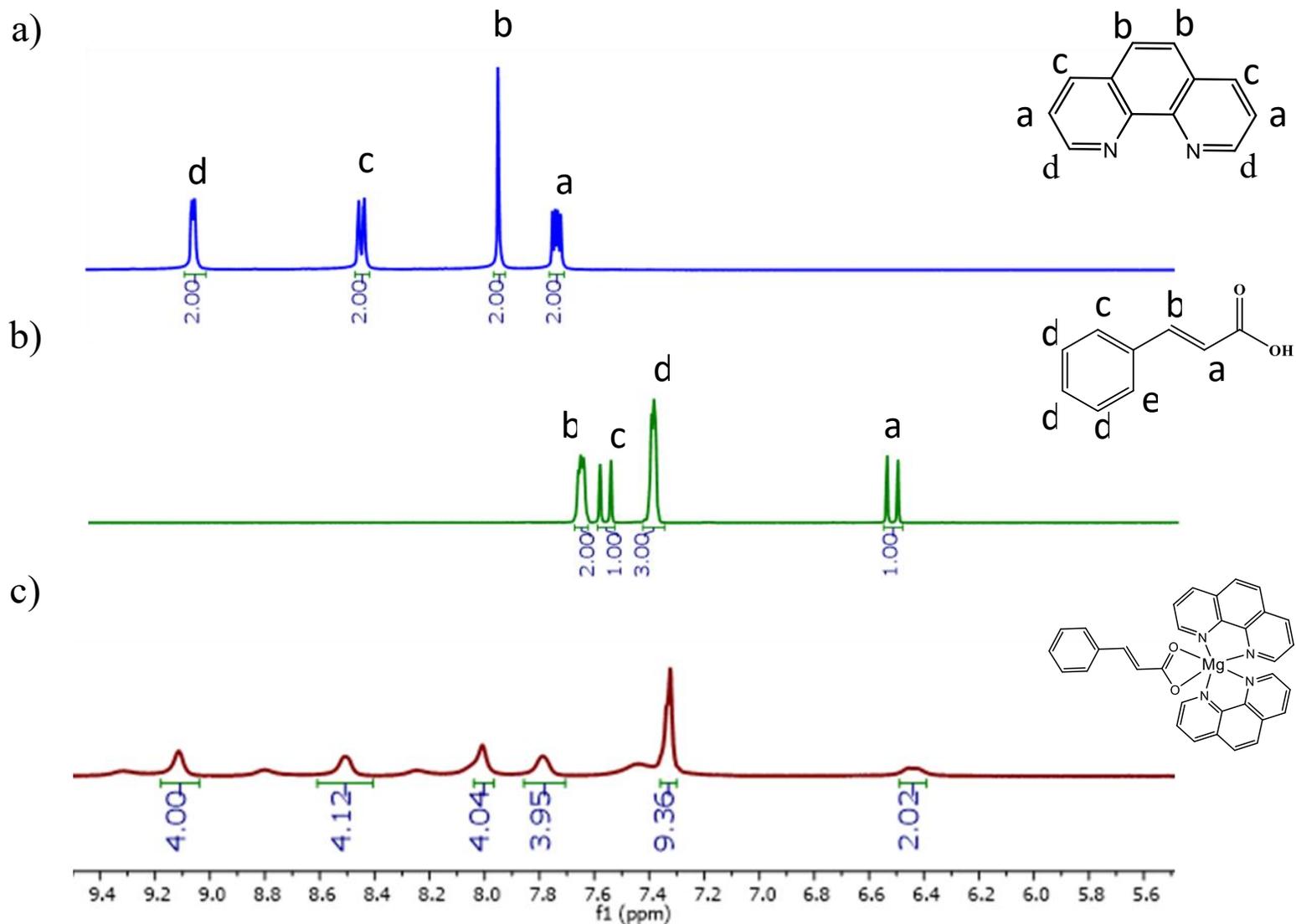


FIGURA 8: Espectros de RMN ^1H 400 MHz em DMSO- d_6 para o ligante (a) 1,10-fenantrolina, (b) ácido cinâmico (c) complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$.

4.2.3 Complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$

Os espectros de RMN de ^1H para os ligantes 1,10-fenantrolina e ácido 4-dimetilamino cinâmico e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ obtidos em DMSO-d_6 são apresentados na FIGURA 9. Os sinais referentes à 1,10-fenantrolina encontram-se na região entre 7,7 e 9,2 ppm, e os sinais referentes ao ácido 4-(dimetilamino) cinâmico estão na faixa entre 6,0 e 7,6 ppm. Como observado nos espectros de RMN de ^1H mostrados nas FIGURAS 7 e 8 o espectro de RMN de ^1H para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ apresenta alargamento de sinal, e, devido a isto, não foi possível atribuir uma estrutura para o complexo formado entre os ligantes 1,10-fenantrolina, o ácido 4-(dimetilamino) cinâmico e o centro metálico magnésio.

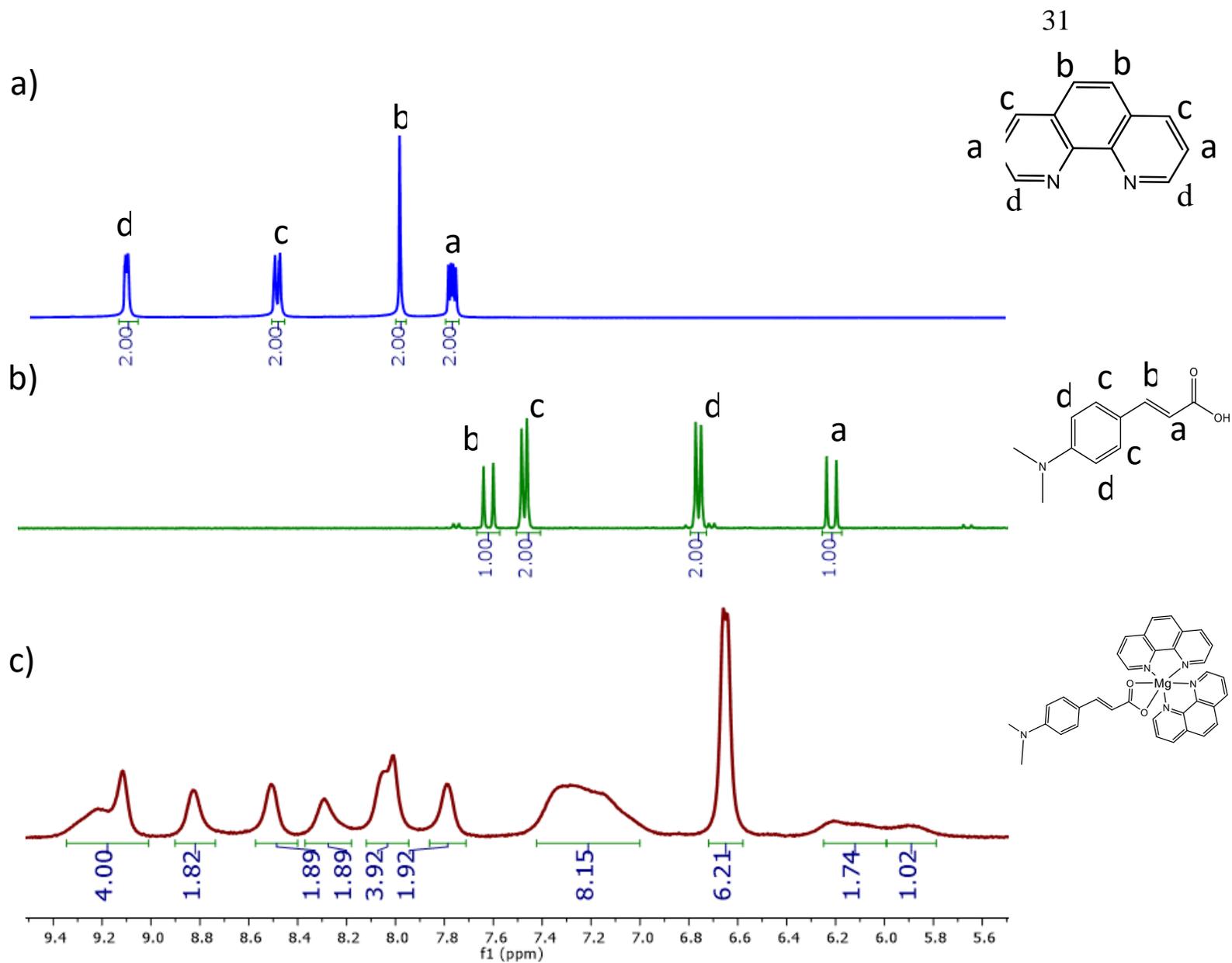


FIGURA 9: Espectros de RMN ^1H 400 MHz em DMSO-d_6 para o ligante (a) 1,10-fenantrolina, (b) ácido 4-dimetil cinâmico (c) complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmca})]^+$.

4.3 Caracterização por espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica bastante utilizada para a identificação de compostos pela análise da massa molar e fragmentações. Desta forma, esta técnica foi empregada como meio para confirmação da composição da esfera de coordenação do íon Mg (II).

A FIGURA 10 mostra o espectro de massa de uma solução metanólica do complexo $\text{Mg}(\text{phen})_2\text{caf}$. Observa-se nesta figura a presença de sinais em m/z 563,15762 (hexacoordenado $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$), m/z 383,08847 (tetraordenado $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{caf})]^+$), e um sinal correspondendo a um ligante de fenantrolina livre em m/z 181,08137.

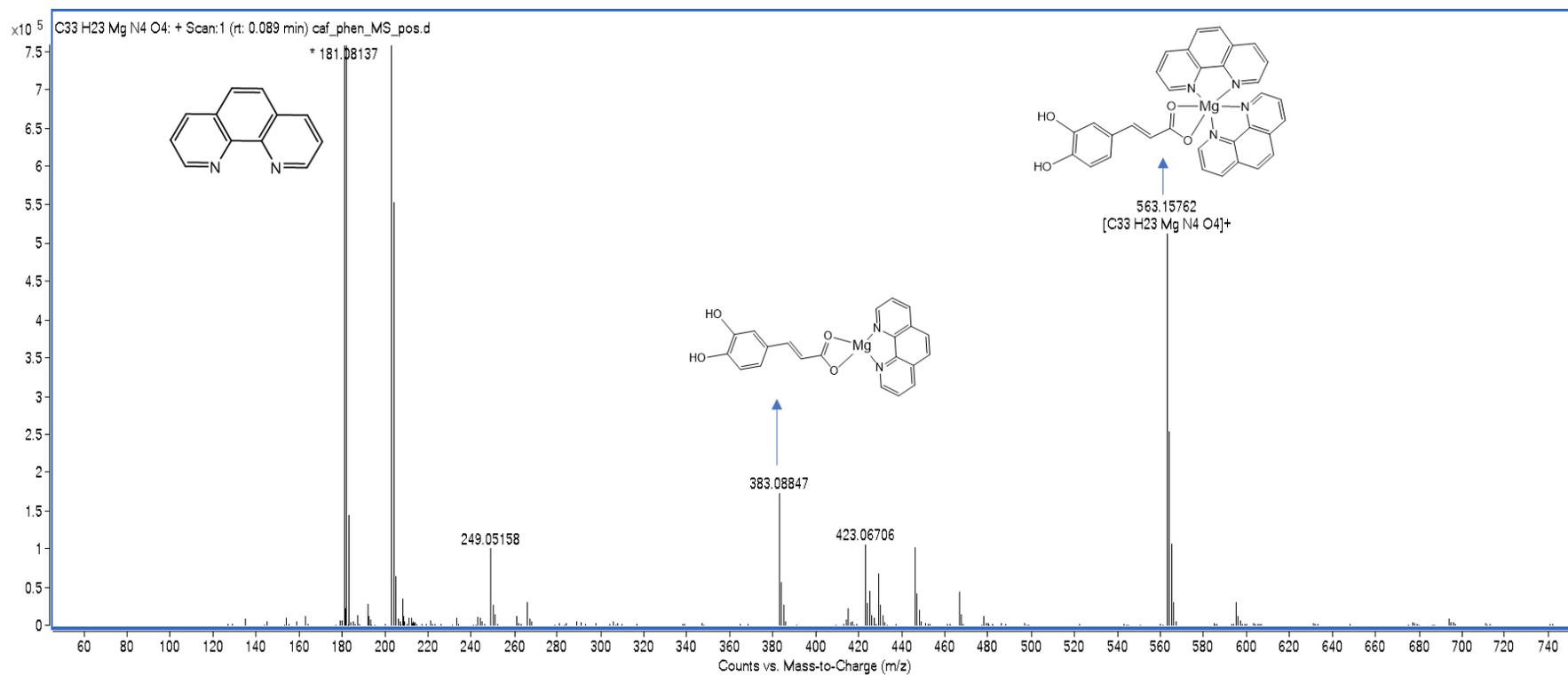


FIGURA 10: Espectro de Massas do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$.

A FIGURA 11 mostra o espectro de massa de uma solução metanólica do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$. Observa-se na figura a presença de 4 sinais, em m/z 531,16809 (hexacoordenado $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$), m/z 351,09880 (tetraacoordenado $[\text{Mg}(\text{phen})(\text{cin})]^+$), m/z 849,24217 (Mg-bi) com um pico de baixa intensidade que é correspondente a um complexo binuclear e um sinal correspondendo a um ligante de fenantrolina livre em m/z 181,08137.

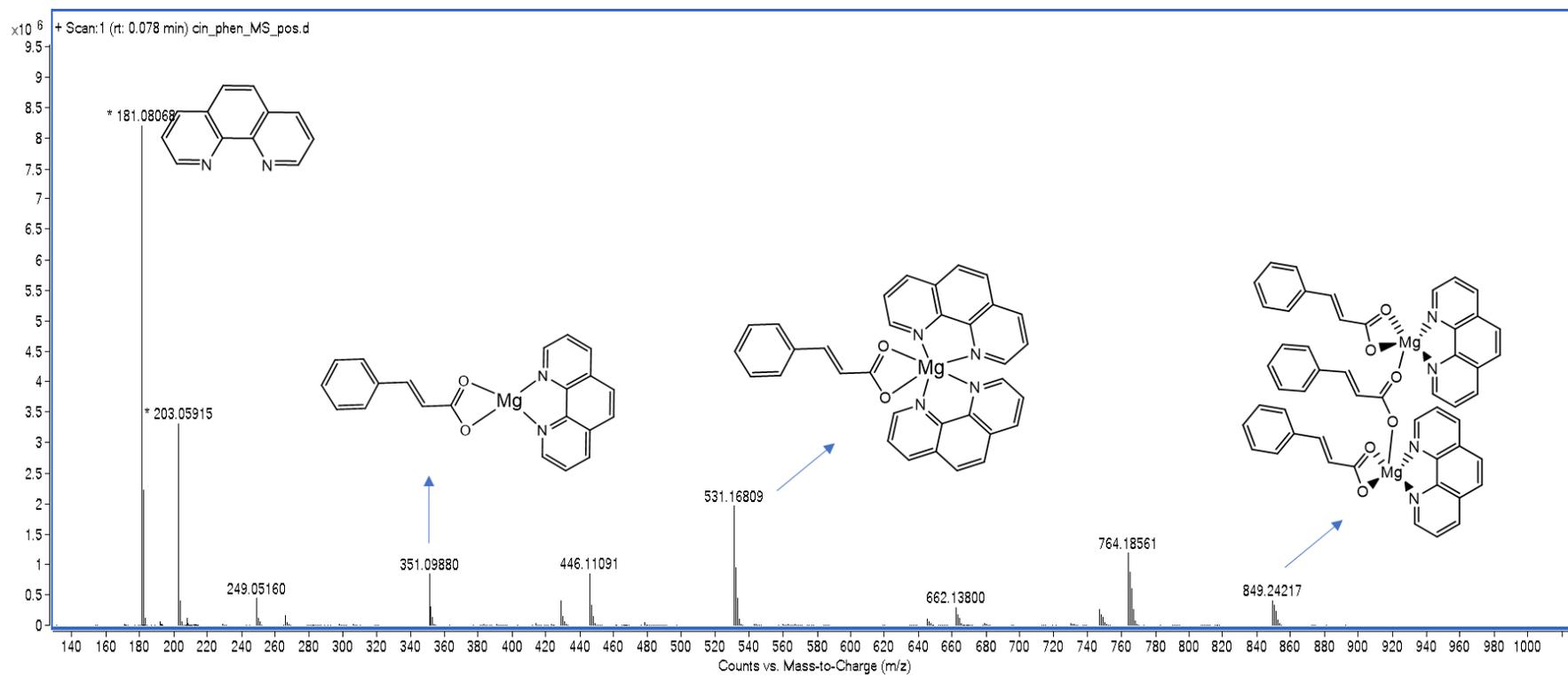


FIGURA 11: Espectro de Massas do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$.

A FIGURA 12 mostra o espectro de massa de uma solução metanólica do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$. Observa-se na figura a presença de 4 sinais em m/z 574,21022 (hexacoordenado $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$), m/z 394,14122 (tetraacoordenado $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$), m/z 978,36869 (Mg-bi) com um pico de baixa intensidade que é correspondente a um complexo binuclear e um sinal correspondendo a um ligante de fenantrolina livre em m/z 181,08137.

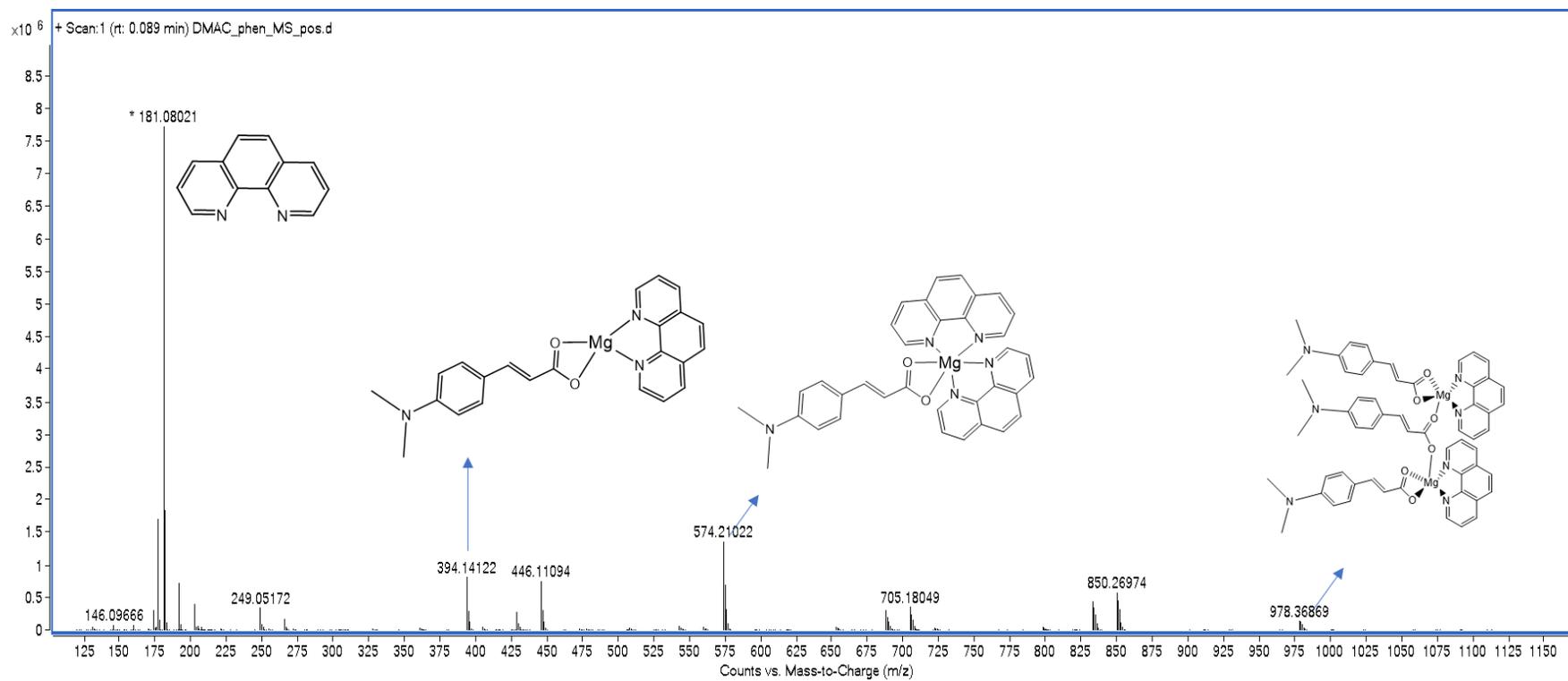


FIGURA 12: Espectro de Massas do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$.

4.4 RMN DOSY ^1H

A técnica de DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) permite discriminar e caracterizar os diversos componentes de uma mistura. Em um espectro DOSY, os deslocamentos químicos são apresentados em uma dimensão e os coeficientes de difusão molecular são mostrados na outra, FIGURA 13. Esta técnica pode detectar qualquer substância que apresente núcleos ativos em RMN⁶⁵.

Os experimentos de RMN DOSY à temperatura de 298 K obtidos para os complexos $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$, $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ em DMSO- d_6 mostraram dois coeficientes de difusão distinguíveis indicando a presença de duas componentes individuais.

Na FIGURA 13(a), complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$, observou-se a fração associada ao ligante 1,10-fenantrolina exibindo difusão mais rápida em comparação à fração do ácido cinâmico. Isto é observado para todos os complexos, na FIGURA 13(b), a porção do ligante livre 1,10-fenantrolina também possui um coeficiente de difusão mais rápida que o dmaca e na FIGURA 13(c), ela apresenta um coeficiente de difusão mais rápida que o ácido cafeico livre.

Não foi possível em tempo hábil realizar os estudos variando-se a temperatura, conforme descrito na literatura⁶⁶ para o complexo de Mg(II)-phen com o ligante isovanalato. Nos estudos realizados com este complexo observou-se os mesmos resultados mostrados na FIGURA 13(a, b e c) quando em temperatura de 298K. Entretanto, os estudos de DOSY realizados para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})\text{Iso}]$ em temperaturas mais baixas (298 – 253 K), mostraram duas difusões distinguíveis, porém com algumas diferenças. O

componente com a difusão mais rápida continuou sendo o ligante livre 1,10-fenantrolina, com um menor valor de coeficiente de difusão devido à temperatura mais baixa e o segundo coeficiente de difusão foi associado aos dois ligantes quando complexados ao centro de magnésio. Portanto, em baixa temperatura, o equilíbrio muda para a formação de apenas um complexo. Em temperatura ambiente, o rápido equilíbrio entre as estruturas pode ser responsável pelas duas difusões diferentes observadas para os complexos.

Os resultados obtidos no DOSY corroboraram com os resultados obtidos no massas onde também foram observados mais de uma estrutura, uma hexacoordenada predominante e outra tetracoordenada indicando um processo de troca de ligante 1,10-fenantrolina, entre as estruturas Mg-hexa e Mg-tetra.

Estes resultados são consistentes também com o alargamento dos sinais nos espectros e RMN de ^1H . Mg(II) tem configuração eletrônica de camada fechada, e os ligantes 1,10-fenantrolina e os compostos fenólicos não apresentam elétrons desemparelhados. O alargamento dos sinais de RMN devem então ocorrer devido à mistura de complexos de Mg(II), um com a estrutura hexacoordenada e outra tetracoordenada em equilíbrio à temperatura ambiente.

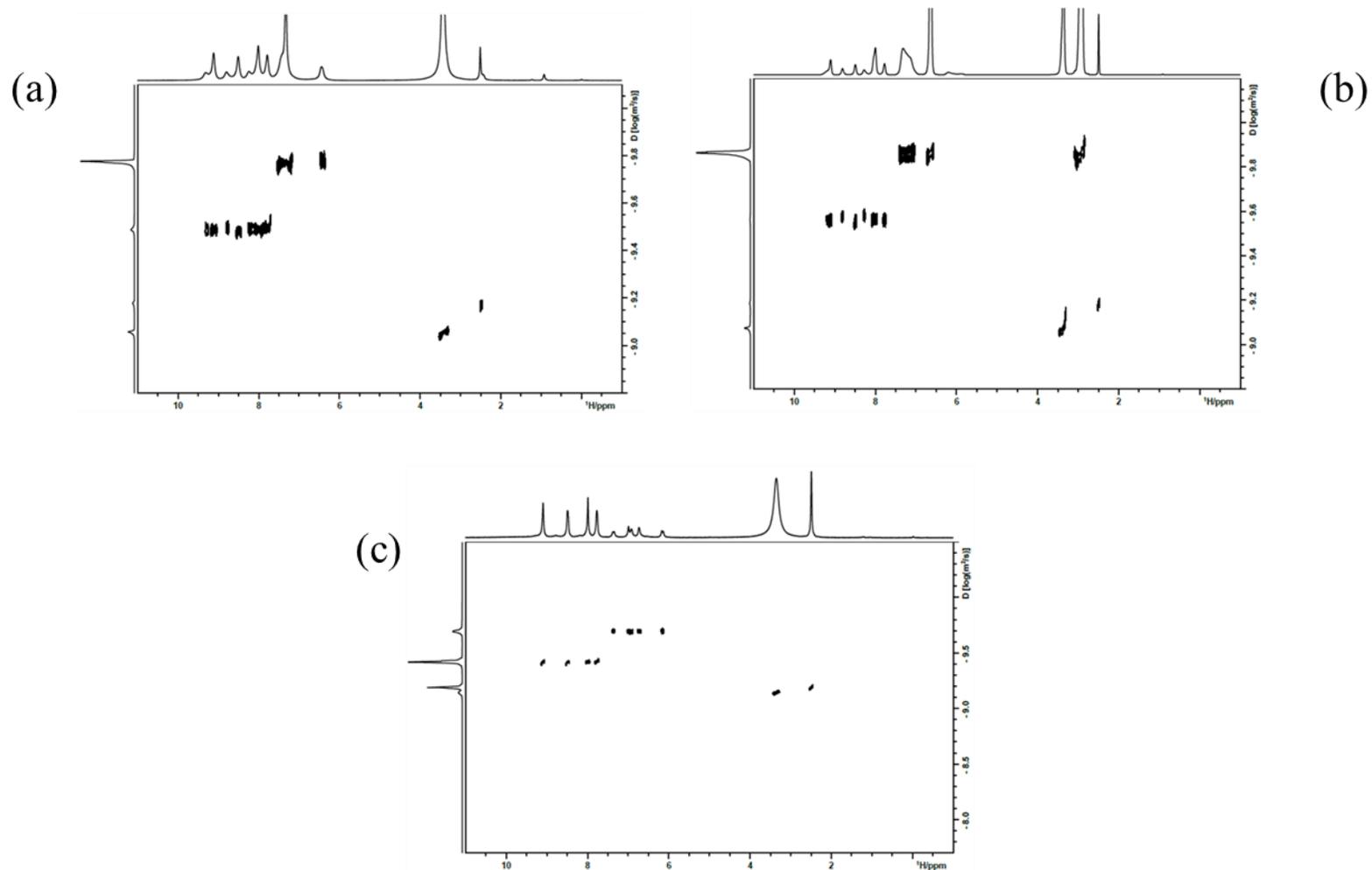


FIGURA 13: Espectros de DOSY ^1H para os complexos $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (a), $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b) e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (c) em DMSO-d_6 .

4.5 Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica dos ligantes e para seus respectivos complexos são mostrados nas FIGURA 14, FIGURA 15 e FIGURA 16. Observa-se bandas de absorção intensas e largas na região do UV-Vis de 250 à 400 nm. Nesta região, o ligante ácido cafeico apresentou dois ombros largos em 285 nm e 312 nm. Já o ligante ácido 4-dimetilamino cinâmico apresentou uma banda larga com máximo em 325 nm. O ligante ácido cinâmico apresentou uma banda de absorção em 269 nm. A coordenação ao fragmento Mg(II)-phen resultou na sobreposição das bandas de absorção.

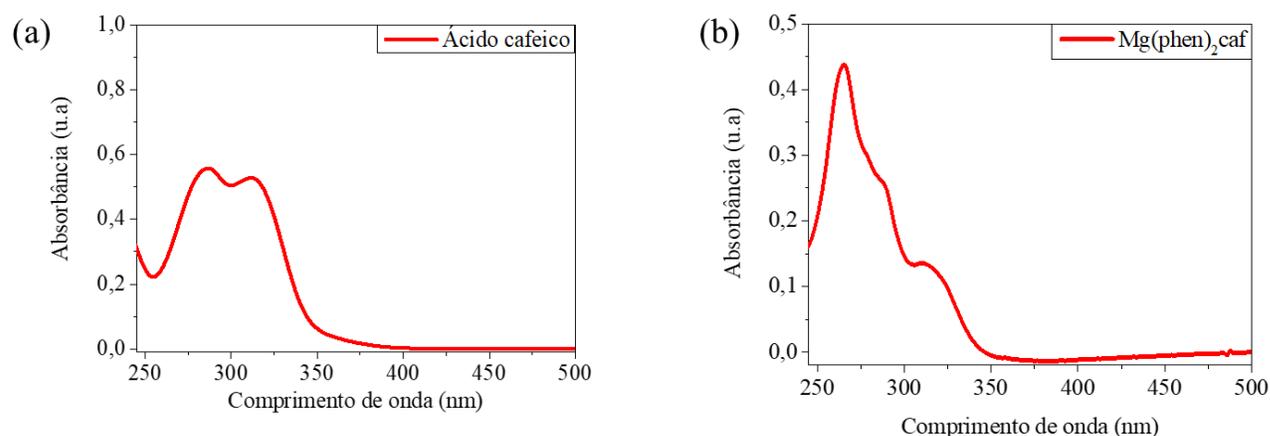


FIGURA 14: Espectro de absorção UV-Vis do ligantes ácido cafeico (a) e do complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ (b) em tampão fosfato pH 7,4.

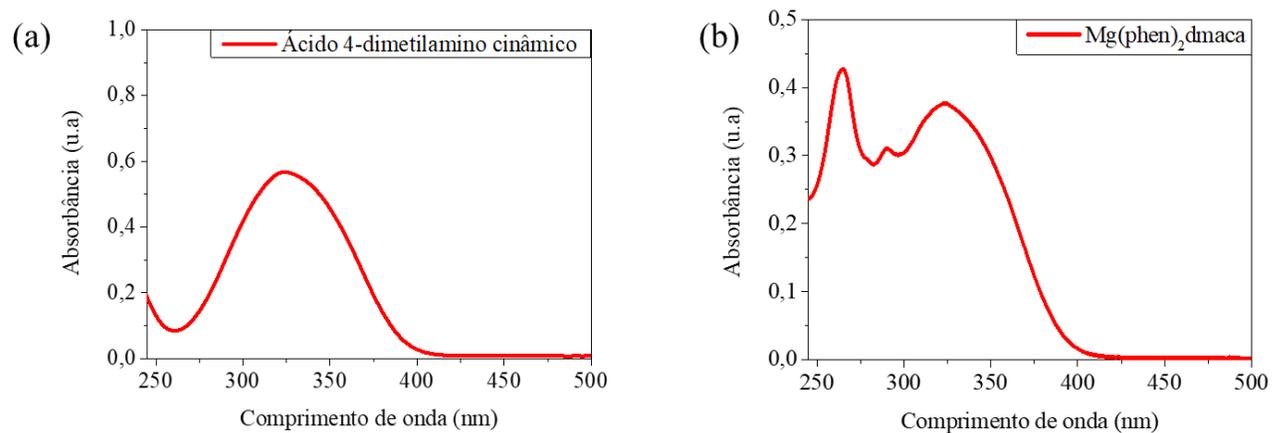


FIGURA 15: Espectro de absorção UV-Vis do ligante dmaca (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ em tampão fosfato pH 7,4.

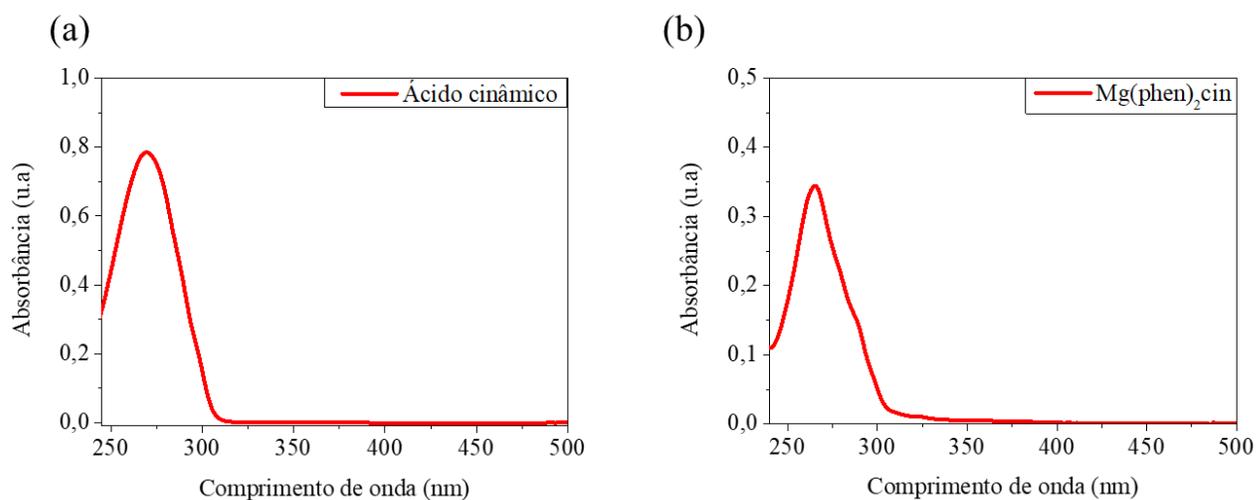


FIGURA 16: Espectro de absorção UV-Vis do ligante ácido cinâmico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (b) em tampão fosfato pH 7,4.

4.6 Luminescência em diferentes valores de pH

Como mostrado na FIGURA 17(a) e (b), o comprimento de onda máximo de emissão tanto do ligante livre quanto do complexo é acompanhado de um deslocamento para maiores comprimentos de onda (445 nm – 462 nm) à medida que o pH do meio aumenta (pH 2 a pH 5). Em pH de solução entre 6 e 11 não foi observado deslocamento no máximo de emissão (462 nm).

Ainda, de acordo com os espectros de emissão obtidos observa-se que ocorre um aumento da intensidade até atingir um máximo em meio básico, pH 9. A partir de pH de solução igual a 10 observa-se uma diminuição da intensidade de emissão, tanto do complexo quanto do ligante, e em pH 12 (espectro cinza), observa-se perda de emissão que pode ser proveniente do efeito da desprotonação do composto, uma vez que a nova estrutura não apresenta emissão.

Portanto, devido ao máximo de intensidade observado para ambos, ácido cafeico livre e o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ serem nos valores de pH entre 7 a 10, infere-se que esta seja a faixa de pH ideal.

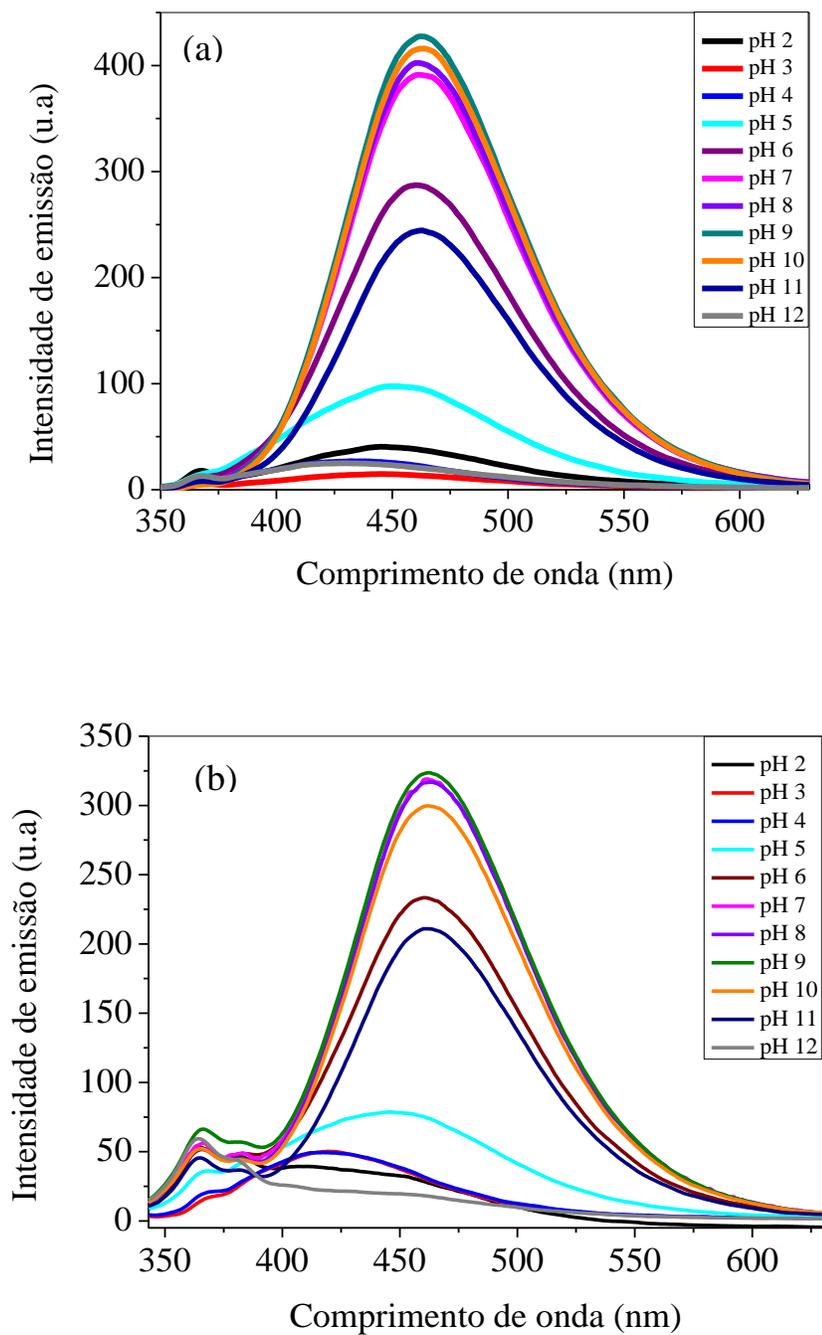


FIGURA 17: Espectro de emissão do ligante livre ácido cafeico (a) e do complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ (b) em diferentes pH com $\lambda_{ex} = 323$ nm.

4.7 Eletroquímica

A FIGURA 18 mostra o voltamograma cíclico do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ na região de potencial entre -1 a +1 V (vs. Ag/Ag^+) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Foram obtidos 30 ciclos no sentido anódico e não foram observados picos de processos oxidativos e nem processos de redução. Como não foram observados picos de oxidação na janela de potencial aplicada (-1 a +1 V), o complexo não deve apresentar características de um bom antioxidante. Um composto antioxidante deve ser oxidado com certa facilidade frente a outro composto, e como não observamos nenhum pico oxidativo no voltamograma cíclico, este composto não oxida com facilidade, portanto, não é caracterizado como um composto antioxidante.

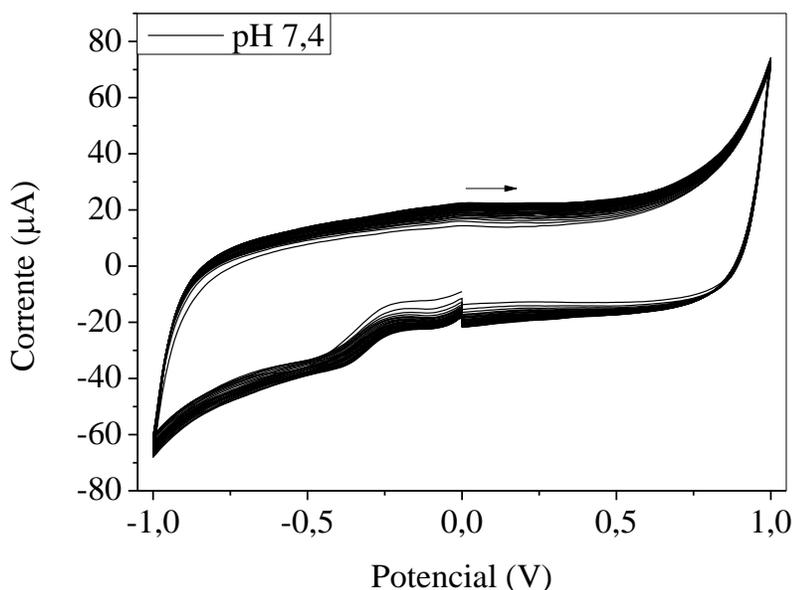


FIGURA 18 : Voltamograma cíclico para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ em tampão fosfato pH 7,4 e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

A FIGURA 19 apresenta os voltamogramas cíclicos para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$. Com o aumento do pH do meio, nota-se uma diminuição do potencial anódico. Em pH 4,5 observa-se um primeiro pico anódico com valor de $E_{\text{pa}} = 0,33 \text{ V}$ e um segundo pico com valor de $E_{\text{pa}} = 0,85 \text{ V}$ e no sentido catódico (redução) observa-se apenas um pico com valor de $E_{\text{pc}} = -0,15 \text{ V}$.

Após 30 ciclos oxidativos observa-se uma estabilização nos valores de potencial. Em pH do meio igual a 7,4 (b) tem-se que o pico anódico em 0,33 V desaparece e surge um novo pico de oxidação em 0,29 V. O segundo pico anódico 0,85 V foi deslocado para o potencial 0,65 V e percebeu-se um único potencial catódico em 0,04 V. Em pH 10 (c) não foram notadas mudanças nos picos de oxidação do complexo, mas o pico catódico foi deslocado para o potencial -0,11 V.

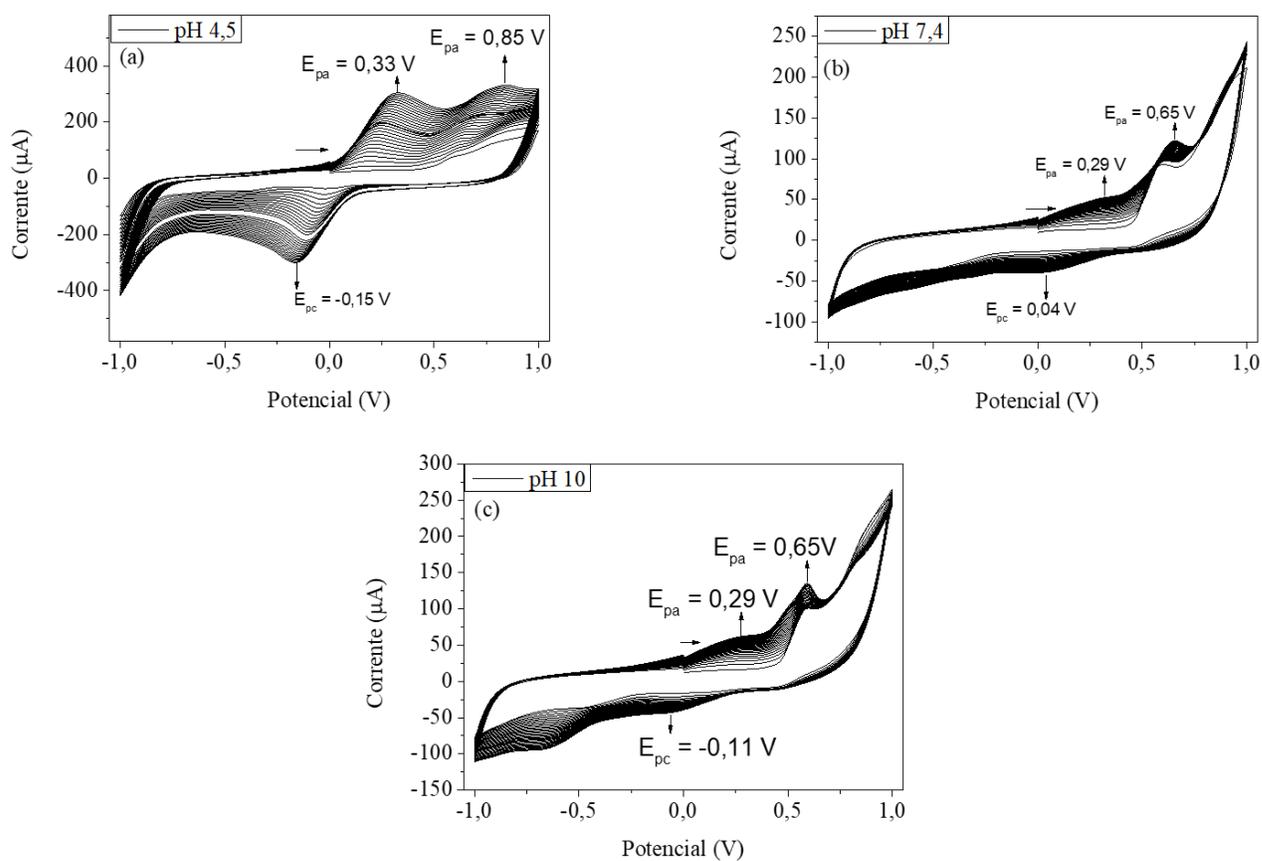


FIGURA 19: Voltamograma para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ em diferentes pH e velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

A influência do pH do meio nos voltamogramas cíclicos do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ é mostrado na FIGURA 20. Observa-se no pH 4,5 dois picos anódicos e dois picos catódicos com o primeiro pico anódico em $E_{\text{pa}} = 0,36 \text{ V}$ e o segundo em $E_{\text{pa}} = 0,70 \text{ V}$, e no sentido catódico um pico de redução em $E_{\text{pc}} = 0,27 \text{ V}$ e um segundo pico em $E_{\text{pc}} = -0,15 \text{ V}$.

Conforme aumenta-se o pH da solução, assim como observado anteriormente para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$, tem-se que os potenciais de pico anódico e catódico são desviados para valores menos positivos, e essa diminuição para valores menos positivos é um indicativo de que a sua atividade antioxidante é termodinamicamente favorecida com o aumento do pH.⁶⁷ Temos na FIGURA 20(b) por exemplo, apenas um potencial de oxidação em $E_{\text{pa}} = 0,46 \text{ V}$ e um potencial de redução em $E_{\text{pc}} = 0,05 \text{ V}$ e na FIGURA 20(c) esse potencial de oxidação é reduzido para valores ainda menos positivos $E_{\text{pa}} = 0,32 \text{ V}$ e $E_{\text{pc}} = 0,08 \text{ V}$. Pode-se observar a estabilidade do complexo mesmo após 30 varreduras no sentido anódico, o perfil do voltamograma não muda significativamente, o que demonstra que as espécies geradas eletroquimicamente são estabilizadas.

A composição de ácido cafeico é dependente do pH ($\text{pK}_{\text{a}1} = 4,4$; $\text{pK}_{\text{a}2} = 8,64$ e $\text{pK}_{\text{a}3} = 12,5$), FIGURA 21. Temos H_3CAF em pH abaixo de 4,4, sendo o primeiro pH estudado pH 4,5 muito próximo da primeira desprotonação do ácido cafeico, espera-se uma mistura de espécies H_3CAF e H_2CAF^- em solução, em pH 7,4 um pouco mais próximo do segundo ponto de desprotonação, tem-se uma maior concentração de espécies H_2CAF^- e o aparecimento de poucas espécies HCAF^{2-} , em soluções mais básicas, por exemplo em pH 10 a espécie HCAF^{2-} é a espécie predominante em solução e começa o surgimento de pouquíssimas espécies de CAF^{3-} , diante destas diferentes espécies presentes no meio devido aos diferentes valores de pH, nota-se mudanças nos voltamogramas cíclicos para os pH estudados⁶⁸.

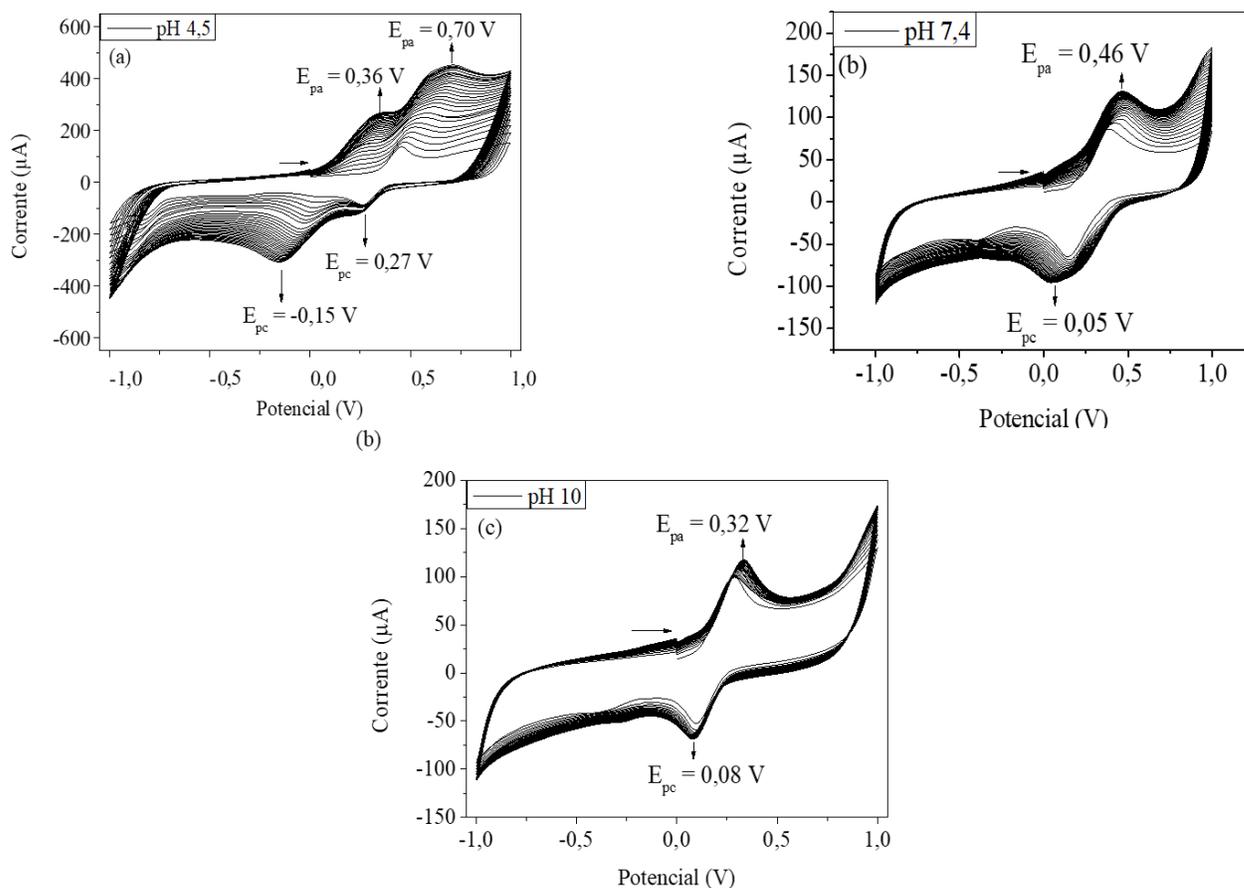


FIGURA 20: Voltamograma para o complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ em diferentes pH e velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

Os processos de oxidação das espécies do ácido cafeico estão representados pelas reações mostradas na FIGURA 21, onde fica mais fácil perceber as espécies que estão presentes e como ocorre os processos de oxidação em cada pH estudado.

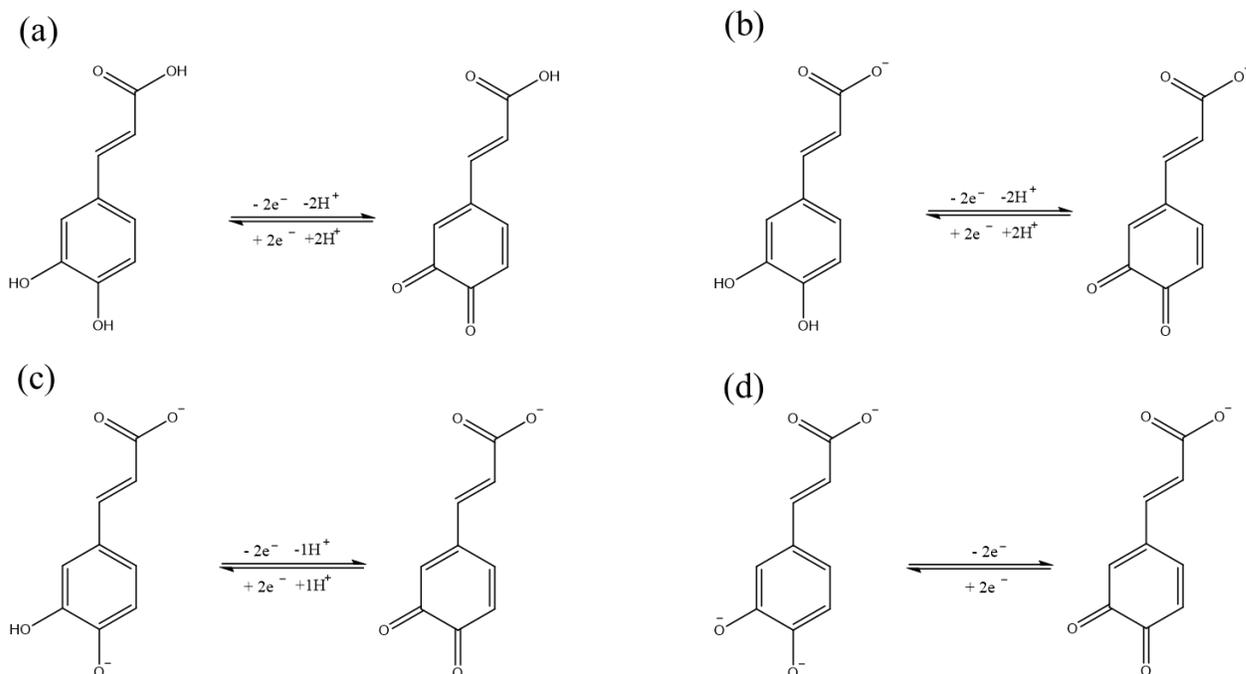


FIGURA 21: Reação de oxidação para as espécies H_3CAF (a), $\text{H}_2\text{CAF}^{\bullet-}$ (b), $\text{HCAF}^{2\bullet-}$ (c) e $\text{CAF}^{3\bullet-}$ (d).

Conforme explicado anteriormente, existem diferentes espécies em solução nos diferentes pH estudado. Na FIGURA 21(a) não houve desprotonação do composto, sendo assim, essa espécie seria em pH menor do que o pK_{a1} . A FIGURA 21(b) tem o grupo carboxílico desprotonado, então é esperado que essa reação seja predominante em valores de pH maiores que o valor de pK_{a1} e menores que o pK_{a2} . Na FIGURA 21(c) além da desprotonação do grupo carboxílico, ocorre a primeira desprotonação do grupo OH do anel aromático na posição *para*, essa reação deve ocorrer predominantemente entre os valores de pH superiores ao valor de pK_{a2} e menores que os valores de pK_{a3} , ou seja, nos valores entre pH 8 – pH 10. Em valores acima de pH 10 inicia-se então a desprotonação completa, $\text{CAF}^{3\bullet-}$ e a reação de oxidação não envolve mais prótons, apenas elétrons^{67,69}.

4.8 Estabilidade fotoquímica

A estabilidade fotoquímica dos complexos $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$, $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ e estabilidade foi investigada submetendo os complexos à irradiação e acompanhando o resultado por RMN ^1H .

Uma amostra de cada complexo foi mantida sob abrigo da luz e uma segunda amostra referente a cada um dos complexos foi colocada sob irradiação durante 150 minutos utilizando-se duas lâmpadas no comprimento de onda de 420 nm ($I_0 = 1 \times 10^{-8}$ einstein s^{-1}). Os espectros de RMN ^1H foram obtidos imediatamente após este procedimento, FIGURA 22, FIGURA 23 e FIGURA 24.

Conforme observado, não ocorreram mudanças significativas nos espectros de RMN ^1H ao comparar-se as amostras mantidas no escuro e as amostras irradiadas indicando que os complexos não sofreram degradação após expostos à irradiação pelo tempo selecionado.

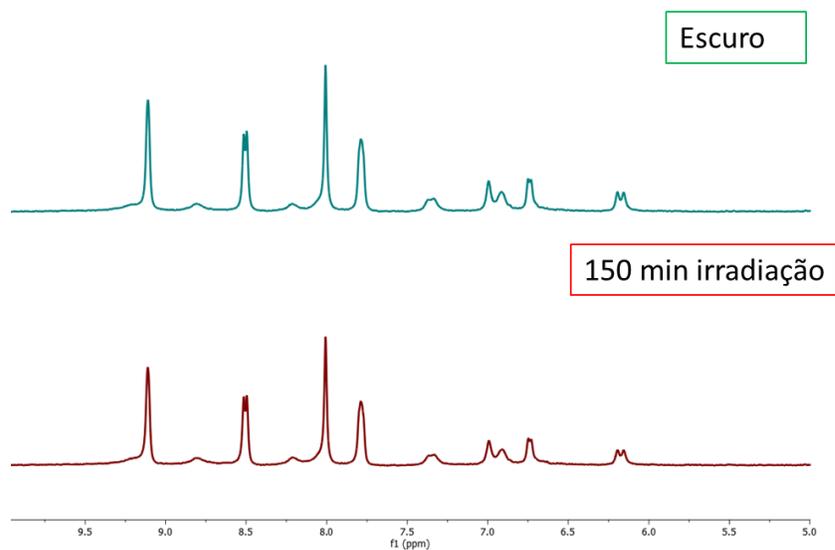


FIGURA 22: Espectro de RMN ¹H em DMSO-d₆ do complexo [Mg(phen)₂(caf)]⁺ no escuro e após 150 minutos de irradiação.

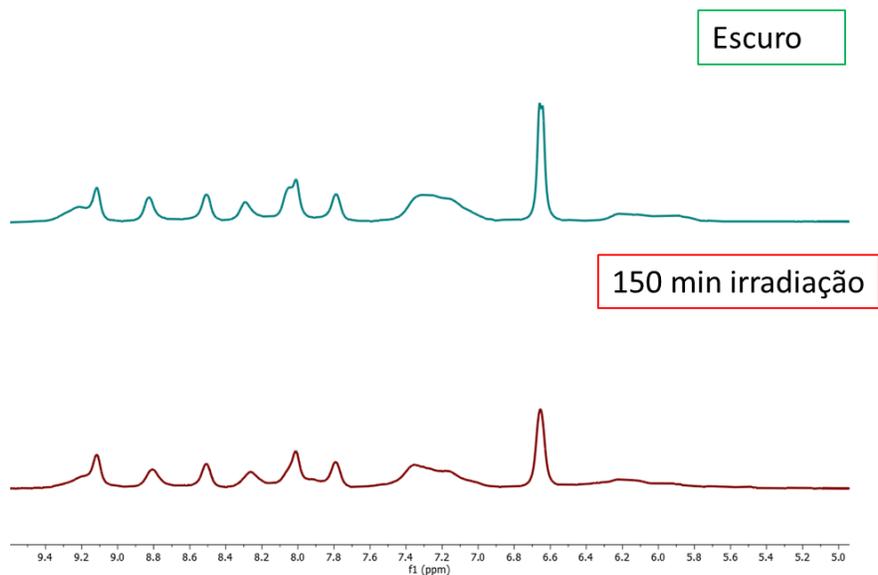


FIGURA 23: Espectro de RMN ¹H em DMSO-d₆ do complexo Mg(phen)₂(dmaca)⁺ no escuro e após 150 minutos de irradiação.

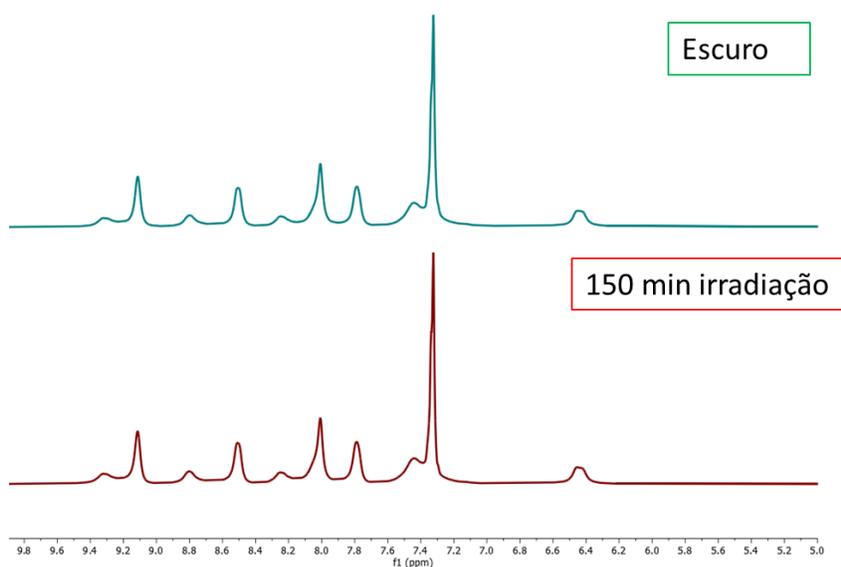


FIGURA 24: Espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ no escuro e após 150 minutos de irradiação.

4.9 Ensaio com a enzima Acetilcolinesterase ECh(E.e)

Diversos trabalhos da literatura descrevem o efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase por produtos naturais⁷⁰⁻⁷². Diante disto, foram feitos testes para avaliar o potencial de inibição do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ e o ligante livre ácido cafeico para a enzima acetilcolinesterase do peixe elétrico (*Electrophorus electricus*) ECh(E.e).

Os experimentos foram realizados seguindo o método espectrofotométrico proposto por Ellman⁵⁹. Neste método, a atividade da enzima é medida pelo aumento da absorção em 412 nm produzida pela formação do íon TNB quando a tiocolina (produzida a partir da hidrólise do substrato acetiltiocolina) presente no meio reacional reage com o DTNB (reagente de Ellman), FIGURA 25.

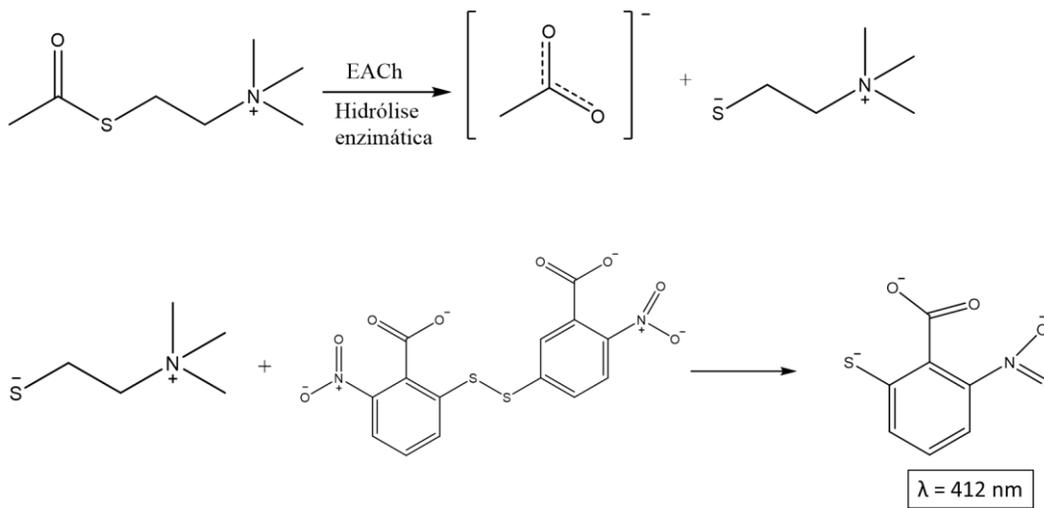


FIGURA 25: Reações envolvidas na inibição enzimática (método Ellman).

A FIGURA 26 mostra o espectro eletrônico na região UV-Vis obtido durante o acompanhamento cinético de formação do íon TNB no sistema controle (ausência do composto teste).

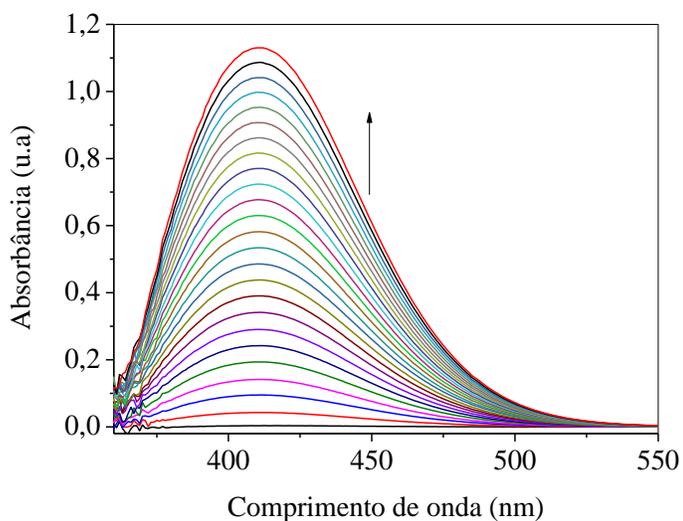


FIGURA 26: Espectro eletrônico UV-Vis da formação do íon TNB no sistema controle [enzima] = 0,025 U mL⁻¹, [substrato] = 0,1 M.

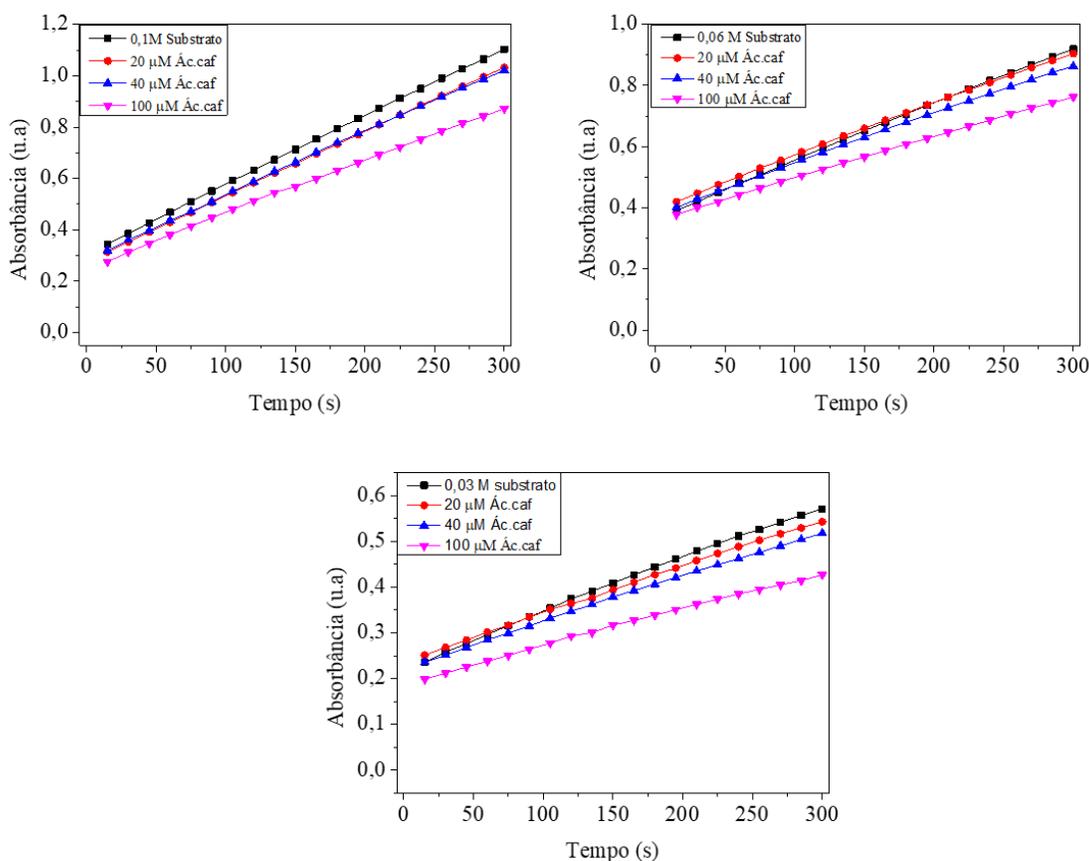


FIGURA 27: Cinética para acompanhamento da formação do íon TNB, [substrato] = 0,1 M (a), 0,06 M (b) e 0,03 M (c) para o ácido cafeico livre, linha preta = sistema controle, vermelha 20 μM , azul 40 μM e rosa 100 μM .

Observa-se pela FIGURA 27, que ao adicionarmos o ligante livre ácido cafeico entre as concentrações (20 – 40 μM), ocorre um mínimo de inibição da enzima (linhas vermelha e azul respectivamente). Ao fazer a adição de 100 μM de concentração, percebe-se um decréscimo maior da atividade da enzima, entretanto esse valor de inibição não é suficiente para que o composto seja um potencial inibidor da atividade da enzima acetilcolinesterase.

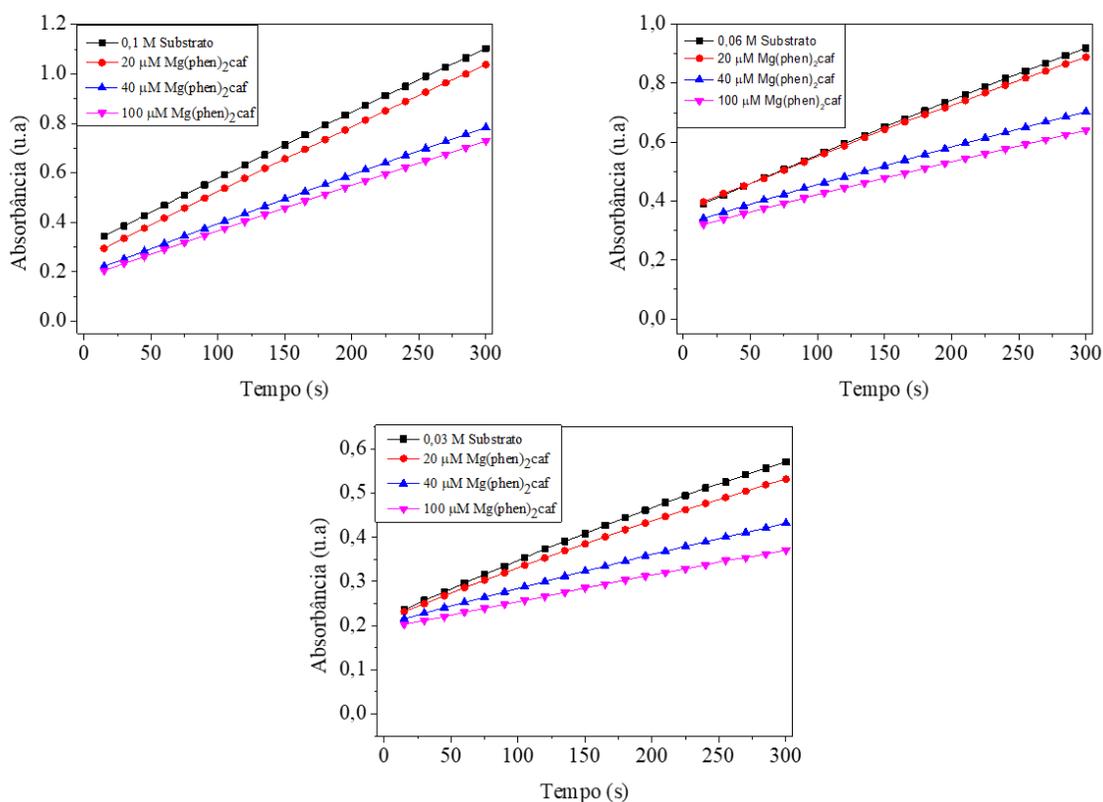


FIGURA 28: Cinética para acompanhamento da formação do íon TNB, [substrato] = 0,1 M (a), 0,06 M (b) e 0,03 M (c), para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$, linhas preta = sistema controle, vermelha 20 μM , azul 40 μM e rosa = 100 μM .

Nota-se pela FIGURA 28 um ligeiro decréscimo de absorbância em comparação com o sistema controle (linha preta) quando utilizado 20 μM do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ no meio reacional. Entretanto, ao adicionarmos concentrações de 40 – 100 μM observa-se uma queda acentuada na absorbância, o que nos leva a crer na sua maior eficiência (em comparação com seu ligante livre) em inibir a enzima acetilcolinesterase.

Entretanto, esse valor de inibição que se observa ao adicionarmos 100 μM (uma inibição de menos de 40 %) é um valor muito baixo para uma concentração tão alta de composto adicionado. Diante desses resultados e comparando com dados da literatura de alguns compostos com atividade inibidora da ECh(E.e), como por exemplo Donepezila⁷³ ($\text{IC}_{50} = 0,01 \mu\text{M}$), Tacrina⁷⁴ ($\text{IC}_{50} = 0,18 \mu\text{M}$) ou o Aldicarb⁷⁵ ($\text{IC}_{50} = 10,47 \mu\text{M}$), dos quais podemos observar seus valores baixíssimos de IC_{50} para inibição da enzima ECh(E.e), portanto, observa-se que tais compostos classificados como potentes inibidores da atividade de inibição da ECh (E.e) não apresentam IC_{50} superior a 10 μM .

Os compostos avaliados no presente trabalho (tanto ligante livre quanto o complexo) em concentrações (100 μM) não foram capazes de atingir a inibição de 50 % da atividade da enzima ECh(E.e).

4.10 Atividade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH•

Um dos métodos amplamente empregado na investigação da capacidade antioxidante fazem uso do radical estável DPPH• por meio de técnicas espectroscópicas UV-Vis e EPR.

O radical DPPH• representado na FIGURA 29, apresenta um máximo de absorção em 517 nm, sendo o espectro representado na FIGURA 30.

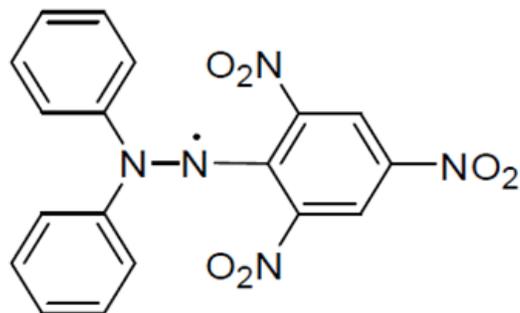


FIGURA 29: Representação da estrutura do radical DPPH•.

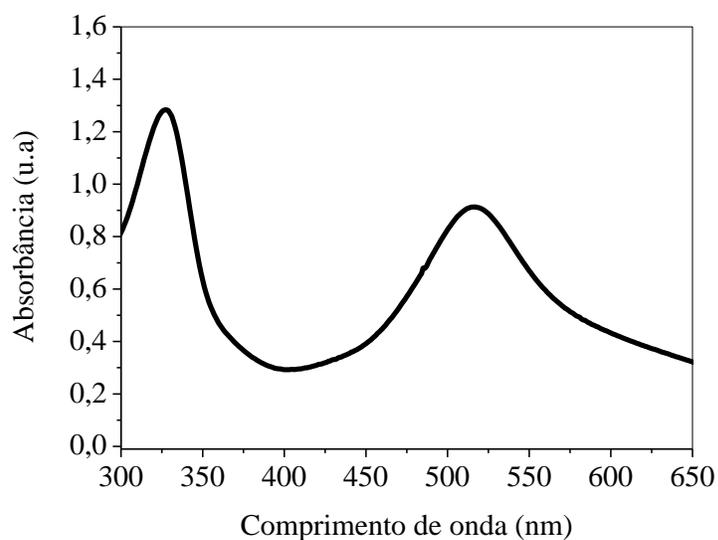


FIGURA 30: Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis do radical DPPH•.

O método escolhido para estudo da inibição do radical DPPH• foi a espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV-Vis. A reação entre o radical e os compostos testados foram acompanhados por meio da diminuição do pico de absorção em 517 nm medidos no espectrofotômetro UV-Vis após o tempo de 45 minutos de incubação no escuro.

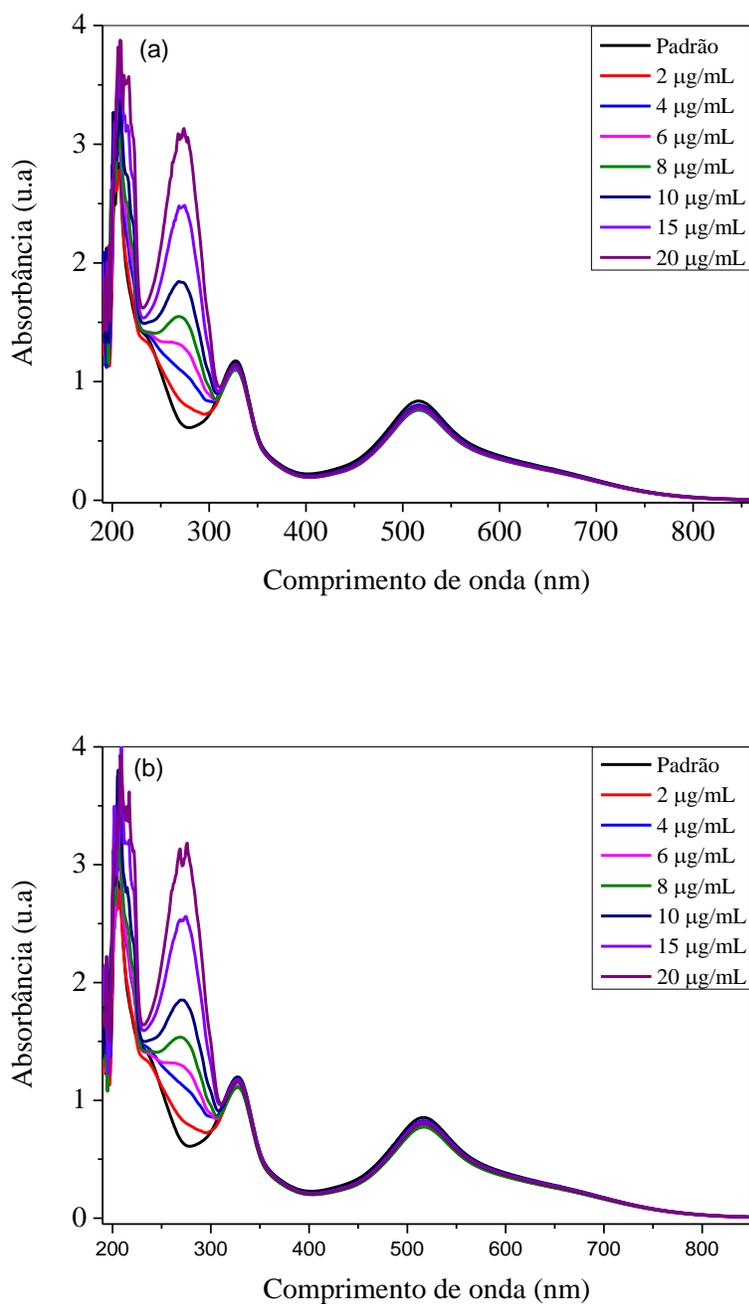


FIGURA 31: Espectro de UV-Vis do radical DPPH na presença de diferentes concentrações de (a) ácido cinâmico e (b) complexo $[Mg(phen)_2(cin)]^+$.

Conforme pode ser visto na FIGURA 31, não houve diminuição significativa de absorvância ao aumentar a concentração do composto testado entre 2 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o ligante livre ácido cinâmico. O mesmo comportamento foi observado para o complexo, $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$. Portanto, ambos não apresentaram atividade de inibição do radical no tempo de análise e nas concentrações em que foram realizados os experimentos.

Na FIGURA 32 são apresentados os espectros de UV-Vis do ligante ácido 4-dimetilamino cinâmico (dmaca) em (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ em (b).

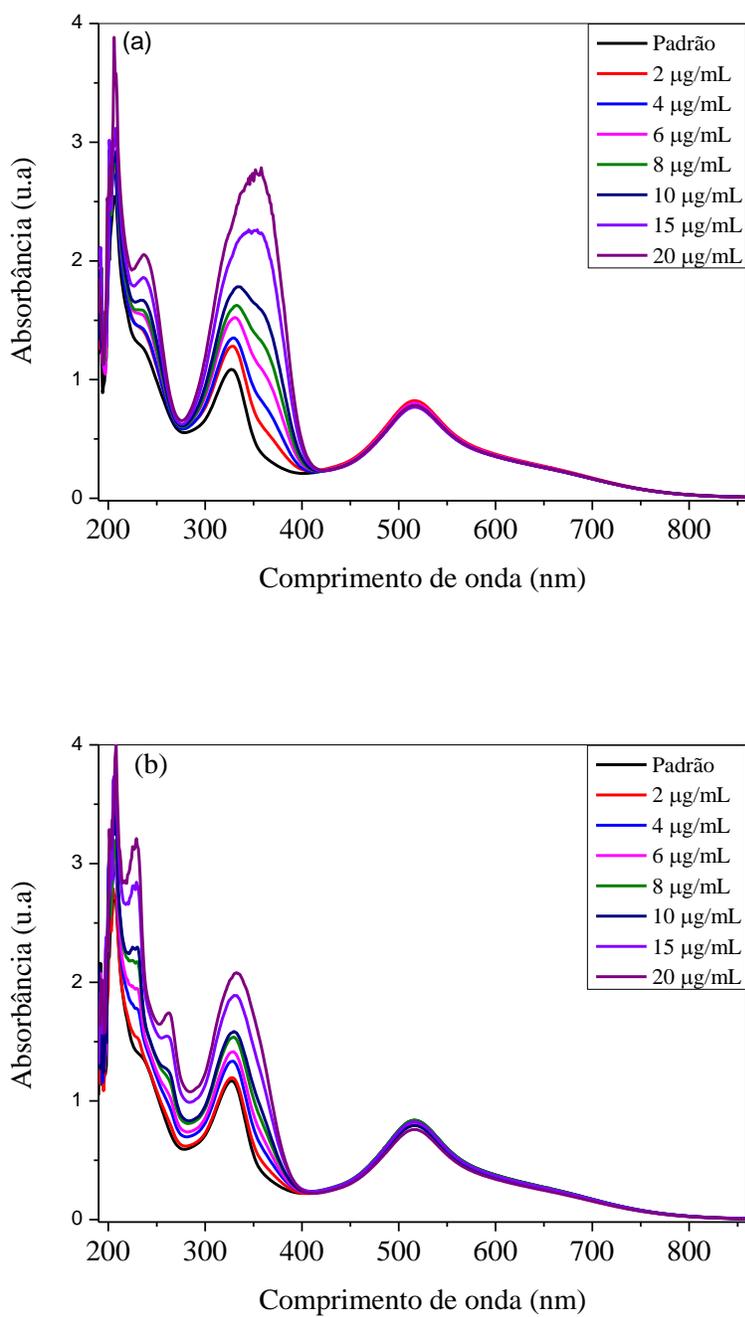


FIGURA 32: Espectro de UV-Vis do radical DPPH na presença de diferentes concentrações de dmca (a) e complexo $[Mg(phen)_2(dmca)]^+$ (b).

O mesmo comportamento foi observado para os compostos com o ligante livre ácido cinâmico e dmaca e seus respectivos complexos de magnésio.

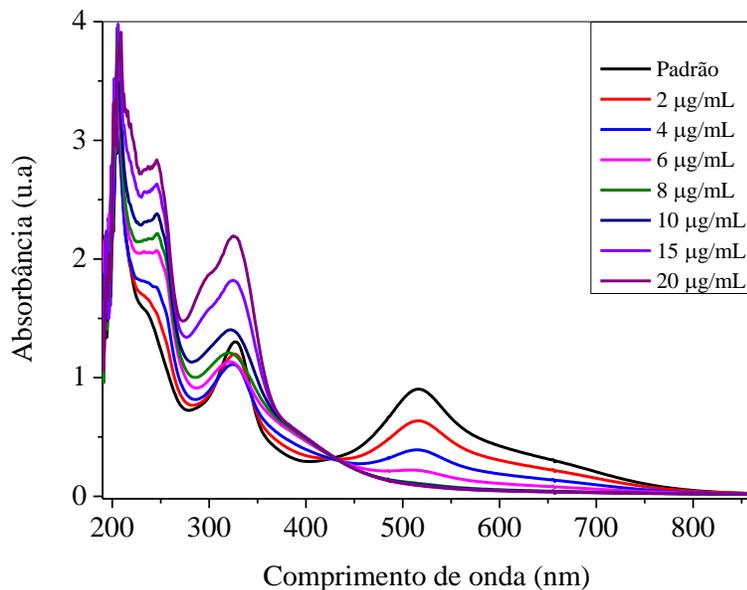


FIGURA 33: Espectro de UV-Vis do radical DPPH na presença de diferentes concentrações do ligante livre ácido cafeico.

Conforme observado na FIGURA 33, o ácido cafeico apresenta atividade sequestradora do radical DPPH• nas concentrações estudadas. Essa inibição é acentuada conforme a concentração do ácido cafeico é aumentada, sendo que em concentrações superiores a $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ observa-se uma inibição quase total do radical. A quantidade necessária de ácido cafeico para reduzir a concentração inicial de DPPH• em 50 % (IC_{50}) foi em torno de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, podendo ser mais bem observado na FIGURA 34.

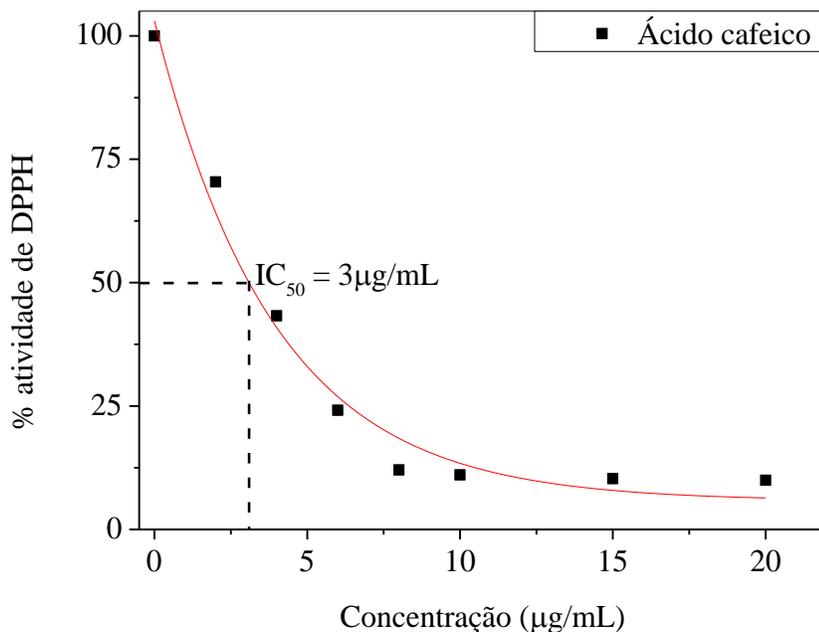


FIGURA 34: Porcentagem de Inibição do DPPH• frente ao ácido cafeico.

O complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ também apresentou atividade sequestradora do radical DPPH•, FIGURA 35. Novamente, conforme aumentou-se a concentração do composto na solução de DPPH•, observou-se uma diminuição gradativa no máximo de absorção no comprimento de onda em 517 nm. O mesmo comportamento que foi observado para o ligante livre ácido cafeico foi observado no complexo e em concentrações superiores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ocorreu inibição máxima do radical.

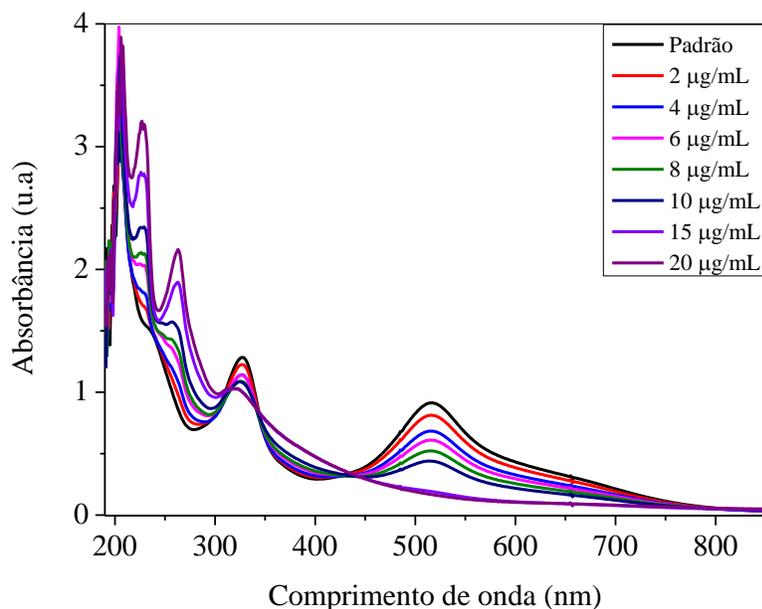


FIGURA 35: Espectro de UV-Vis do radical DPPH• na presença de diferentes concentrações do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$.

Devido a sua estrutura química, o radical DPPH• é um radical livre bastante estável, pois possui três anéis aromáticos que conferem uma importante estabilização devido ao efeito de ressonância, conferindo uma maior estabilidade ao radical. Além de possuir estabilização por meio da deslocalização de elétrons nos grupos nitro e nos átomos de nitrogênio, que são grupos que permitem essa deslocalização eletrônica.

O método DPPH é rápido, fácil, confiável e não requer uma reação e dispositivo especial. O DPPH• é um radical sintético estável que não se desintegra em água, metanol ou etanol, portanto é bastante utilizado para avaliar a atividade de eliminação de radicais livres. O radical possui em solução alcoólica uma coloração violeta com absorção entre 515 – 520 nm. Uma substância antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio para a molécula de

DPPH•, originando a forma reduzida DPPH-H. Desta forma, ocorre perda da coloração violeta, passando a uma coloração violeta claro com o passar do tempo e chegando, finalmente, a coloração amarelada quando a reação se completa.

Observa-se que das estruturas químicas dos ligantes e dos complexos estudados, apenas o ligante livre ácido cafeico e o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ apresentam átomo de hidrogênio, o qual poderia ser doado para levar à redução do radical DPPH•. Temos então que não somente é necessário ter a ligação O-H (mais fácil de ser clivada), entretanto a clivagem homolítica onde as estruturas como por exemplo o polifenol ou um composto fenólico onde a clivagem homolítica leva a geração de uma espécie que será estabilizada por meio de ressonância, o que é o caso do composto ácido cafeico e o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$.

Conforme foi observado, nenhuma espécie que não poderia doar átomo de hidrogênio teve capacidade antioxidante frente ao radical no tempo estudado. Foi proposto então um mecanismo (FIGURA 36) de como poderia ser feita essa inibição do radical DPPH• pelo complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$, ou do ligante livre ácido cafeico, devido a ambos possuírem dois átomos de hidrogênio, pode-se esperar então que ocorra a reação com 2 mol de moléculas do radical DPPH•.

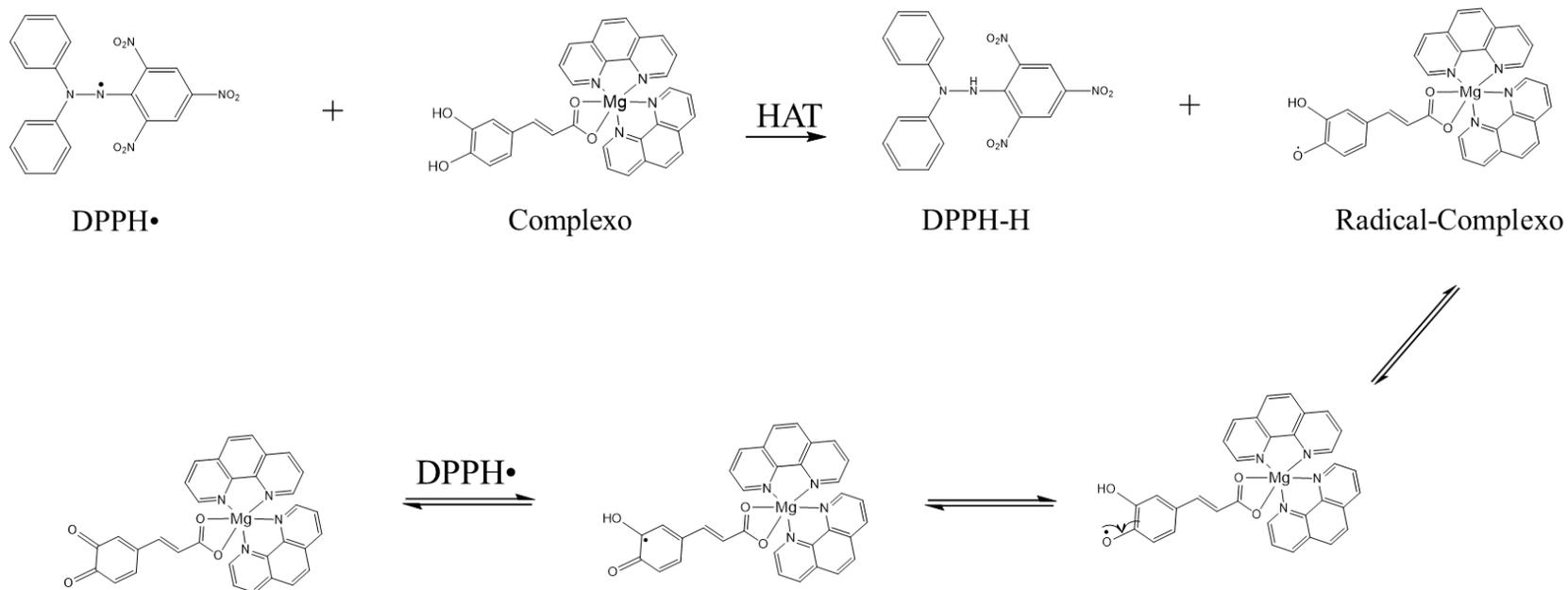


FIGURA 36: Proposta de mecanismo para inibição do radical DPPH pelo complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ por transferência de próton.

4.11 Atividade sequestradora de radicais $O_2^{\cdot-}$

Um ensaio indireto para determinação da capacidade da superóxido dismutase (SOD) de inibir as reações induzidas pelo ânion radicalar superóxido foi realizado. Pelo método de redução da riboflavina na presença de metionina e induzido pela irradiação com luz de 420 nm avaliou-se a capacidade antioxidante dos complexos em relação ao radical superóxido.

Essa análise é observada por meio da espectroscopia na região do UV-Vis, monitorando-se o decaimento da absorbância no comprimento de onda em 560 nm referente à formação do formazano a partir da redução do NBT por $O_2^{\cdot-}$.

Na concentração testada observa-se que o efeito de inibição aumenta com o aumento da concentração do complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ e ácido cafeico livre, FIGURA 37, e do complexo $[Mg(phen)_2(dmaca)]^+$ e ácido 4-(dimetilamino) cinâmico, FIGURA 39.

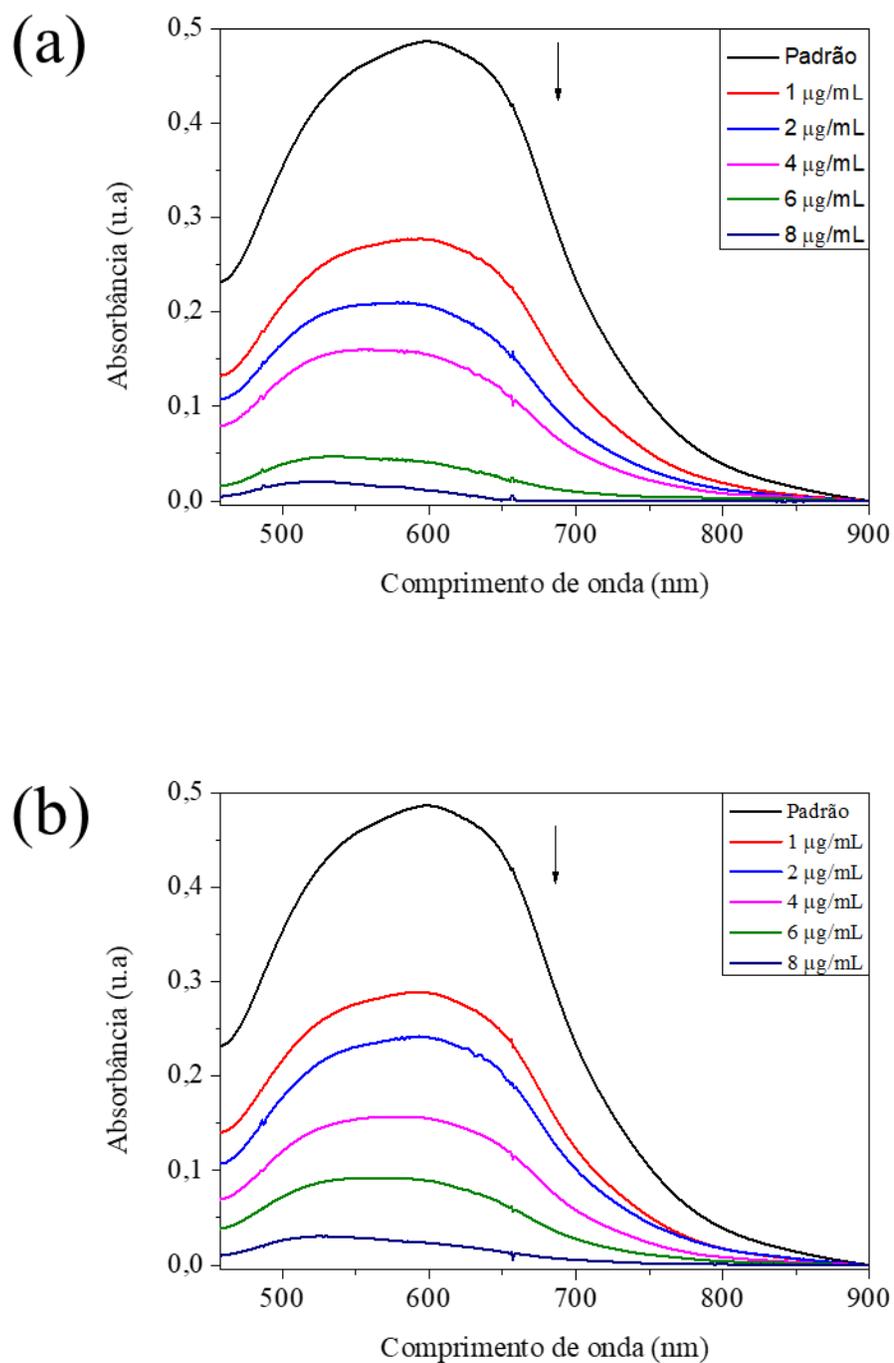


FIGURA 37: Espectro de UV-Vis ensaio NBT variando a concentração do ligante ácido cafeico (a) e do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (b).

Os valores de IC_{50} (concentração do composto necessário para inibir em 50 % a formação de radical superóxido $O_2^{\bullet-}$) estão representados na FIGURA 38 para o ácido cafeico e para o complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$, respectivamente.

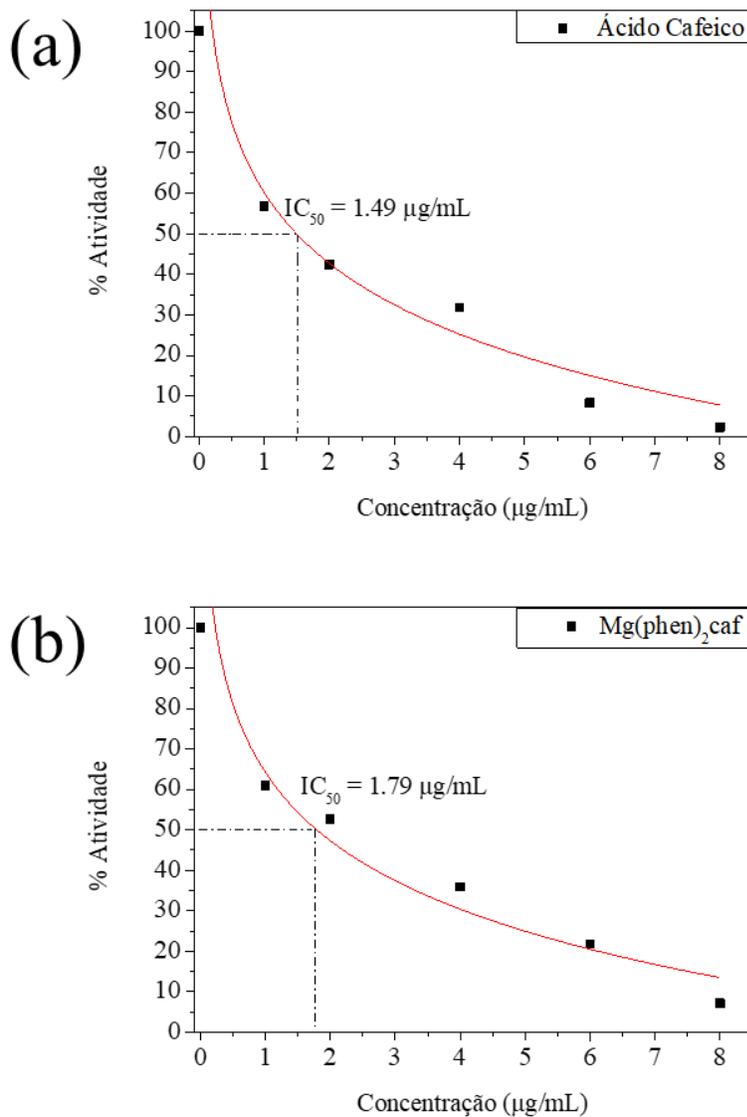


FIGURA 38: Porcentagem da atividade do ânion superóxido variando a concentração do ligante ácido cafeico (a) e complexo $[Mg(phen)_2(caf)]^+$ (b).

Observando-se a FIGURA 37, nota-se um decréscimo nítido em concentrações baixíssimas do composto analisado, sendo que na concentração mínima ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) adicionada do composto observa-se uma grande atividade de inibição devido ao máximo de absorbância em 560 nm apresentar uma queda acentuada. Conforme aumento na concentração, essa banda em 560 nm passa a diminuir até quase completa extinção, o que nos mostra que esses compostos testados atuam fortemente na inibição do radical superóxido.

Sendo nítida a atividade antioxidante ilustrada na FIGURA 38, onde é apresentada a porcentagem de inibição do ânion superóxido em função da concentração de composto. A quantidade necessária para inibir 50 % da atividade do ânion superóxido é $\text{IC}_{50} = 1,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o ligante ácido cafeico e $\text{IC}_{50} = 1,79 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$. Portanto, estes compostos apresentam atividade antioxidante frente ao radical superóxido em concentrações baixas.

Outro composto em que se observou decréscimo na absorção em 560 nm, ou seja, inibição da atividade do radical superóxido foram os compostos dmaca e seu complexo. Pode-se notar na FIGURA 39 que o aumento da concentração do composto faz com que ocorra uma diminuição da banda no comprimento de onda máximo em 560 nm, tanto para o ligante livre quanto para a forma complexada, entretanto, a forma complexada exibe uma maior atividade antioxidante se comparada com o ligante livre dmaca.

A complexação com magnésio e fenantrolina fez com que essa atividade antioxidante fraca no dmaca livre fosse potencializada, chegando a uma porcentagem de inibição em $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ bastante significativa, FIGURA 40.

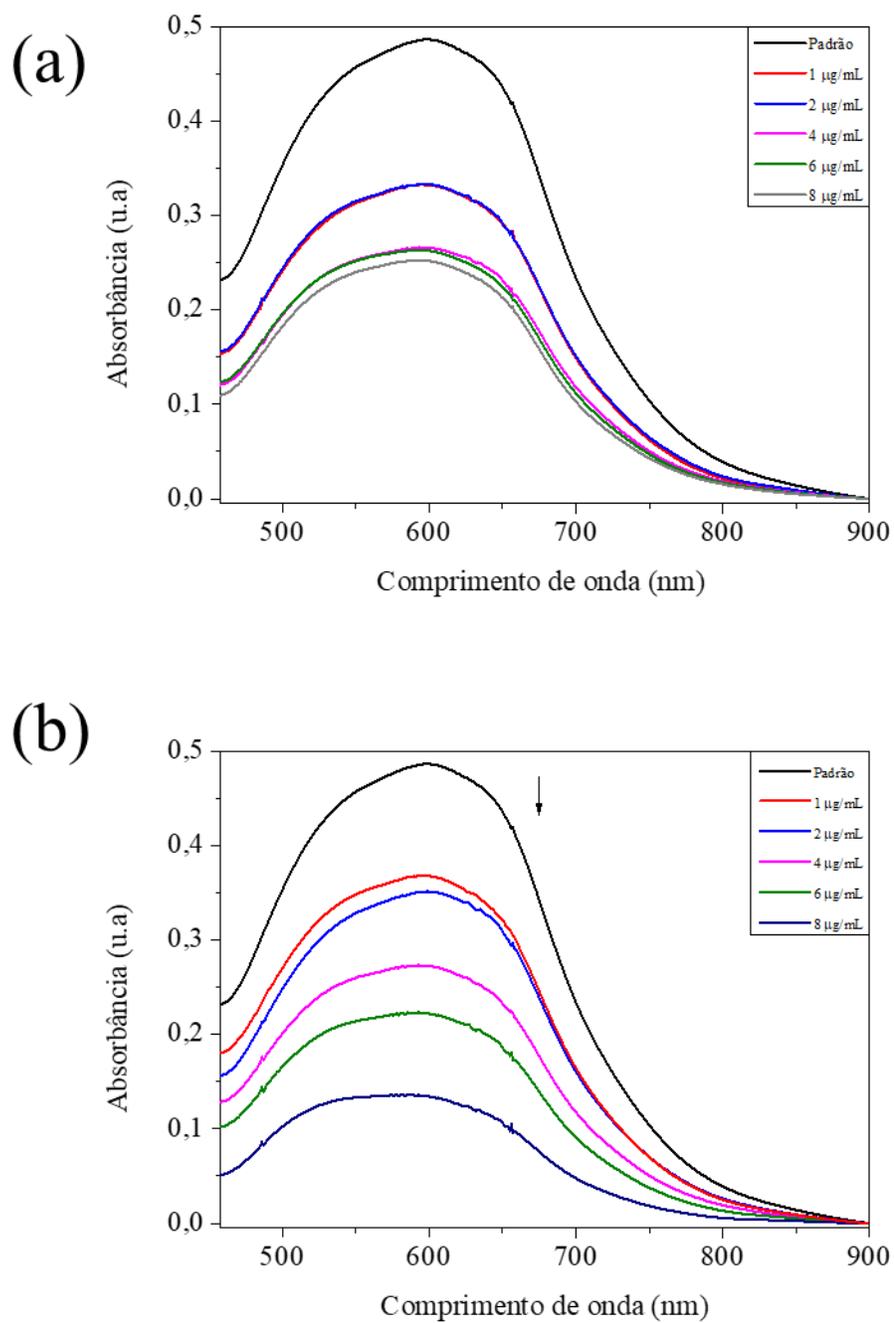


FIGURA 39: Espectro de UV-Vis ensaio NBT variando a concentração do ligante dmca (a) e complexo $[Mg(phen)_2(dmca)]^+$ (b).

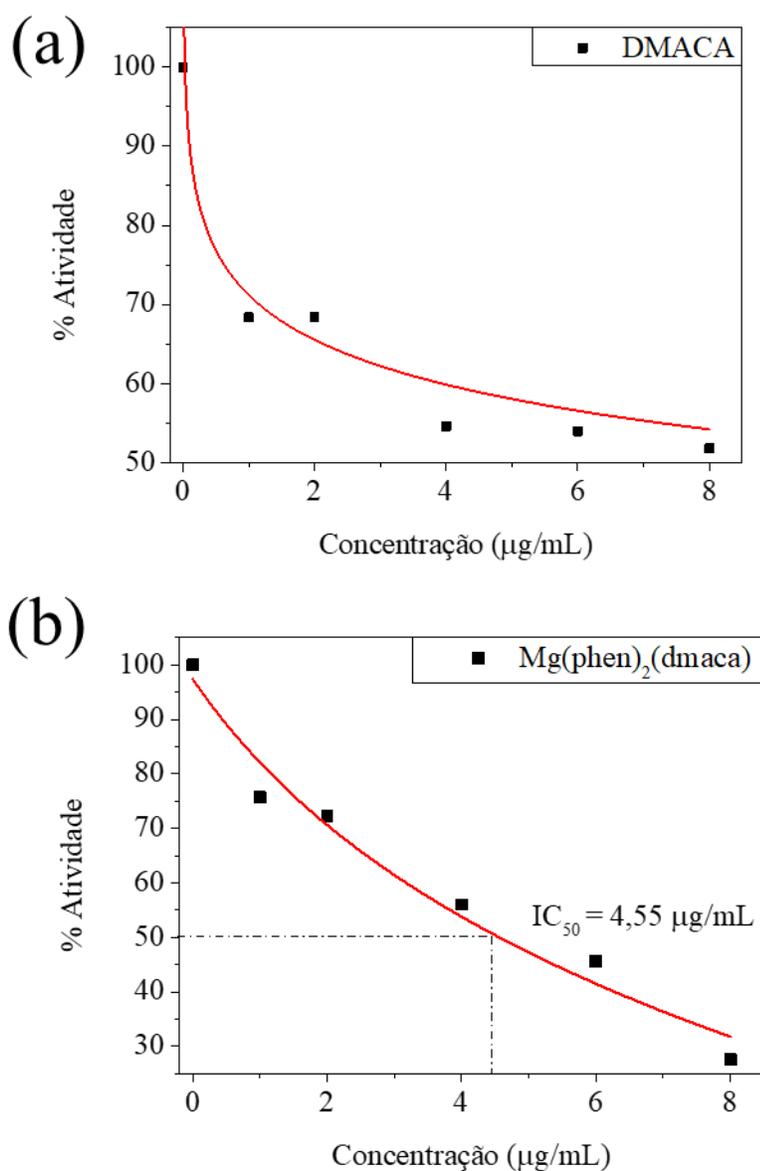


FIGURA 40: Porcentagem da atividade do ânion superóxido variando a concentração do ligante dmaca (a) e complexo $[\text{Mg(phen)}_2(\text{dmaca})]^+$ (b).

Nota-se a diminuição de atividade do ânion superóxido para o ligante dmaca e a forma complexada conforme aumenta a concentração, onde o ligante livre não consegue inibir 50 % da atividade mesmo na concentração máxima, enquanto o complexo tem um valor de $\text{IC}_{50} = 4,55 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O ácido cinâmico e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ não apresentaram atividade de eliminação de radical superóxido, independente da concentração, FIGURA 41.

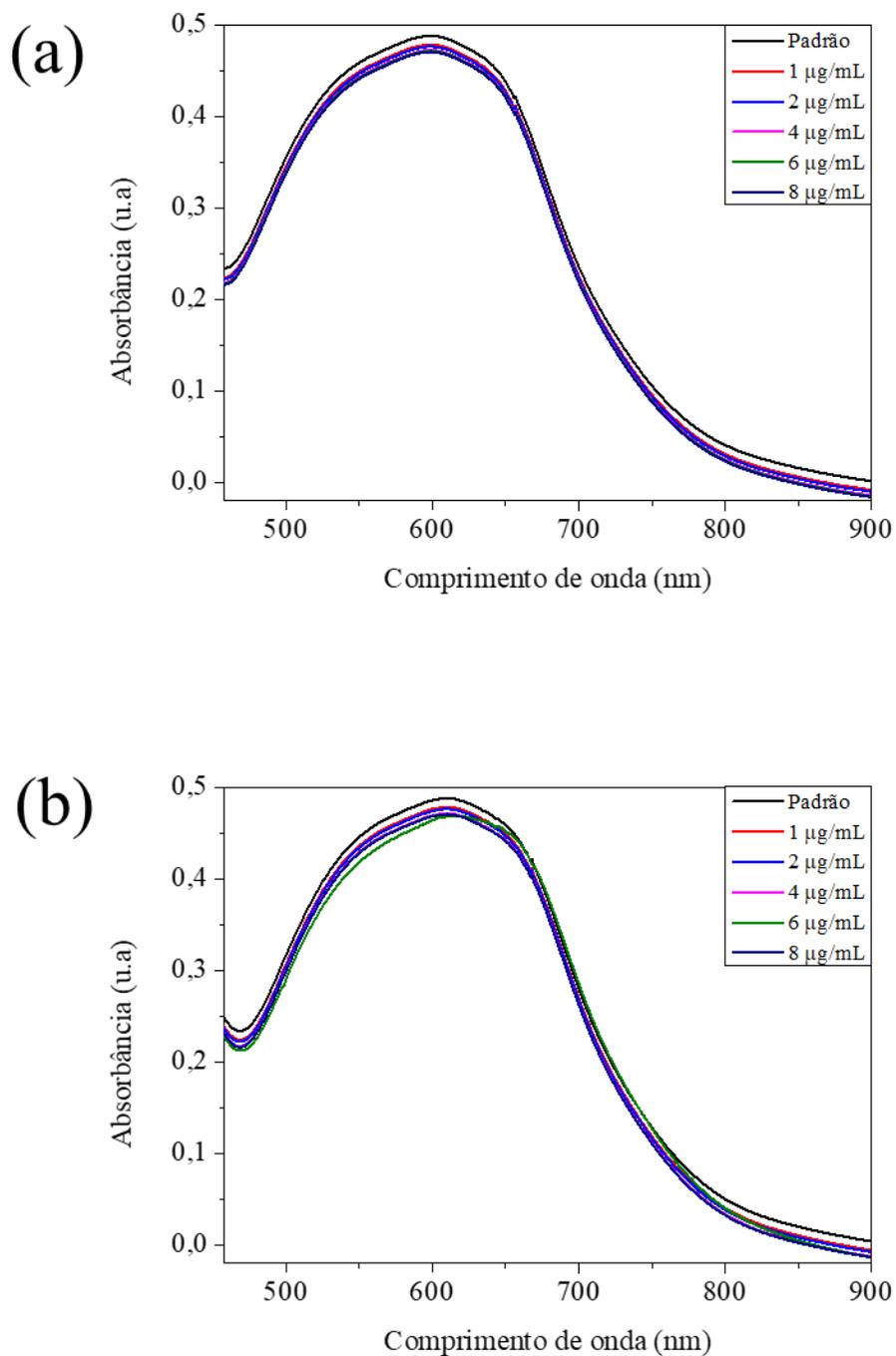


FIGURA 41: Espectro de UV-Vis ensaio NBT variando a concentração do ligante ácido cinâmico (a) e complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{cin})]^+$ (b).

4.12 Desativação de oxigênio singleto

Entre os métodos disponíveis para detecção de produção de $^1\text{O}_2$ amplamente aplicado é o uso da ressonância paramagnética de elétrons (EPR). Neste método, utiliza-se uma espécie spin-ativa detectável com um padrão de linha distinto. Assim, a oxidação da espécie diamagnética TEMP (2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol) por oxigênio singleto irá produzir uma espécie radical paramagnética TEMPO (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) que é facilmente detectável no EPR, FIGURA 42.

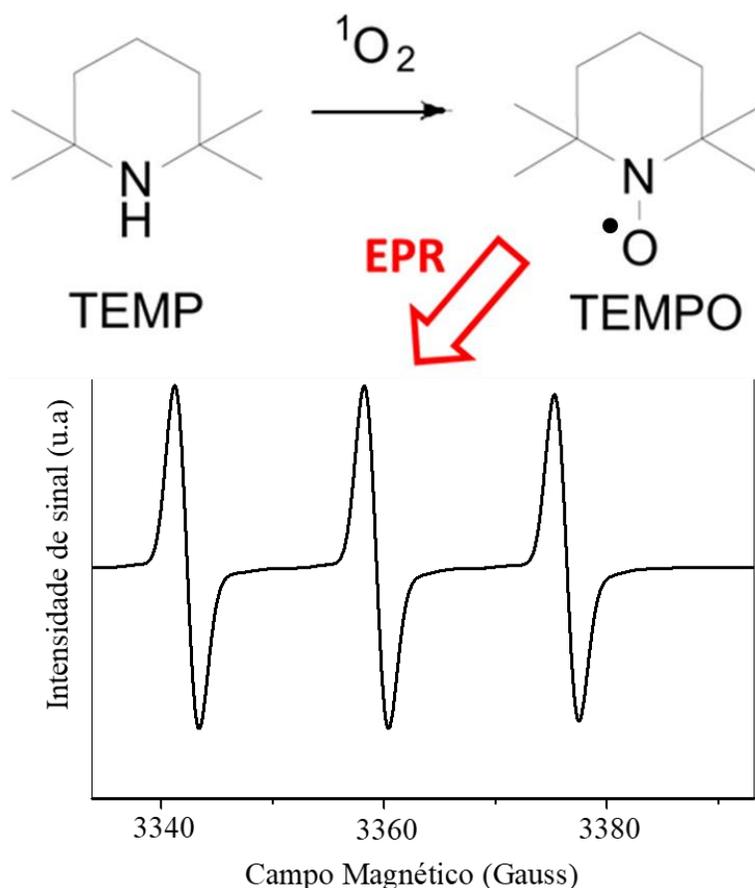


FIGURA 42: Esquema de detecção de oxigênio singleto via técnica de EPR, adaptado.

A produção de $^1\text{O}_2$ por um fotossensibilizador (riboflavina) é um exemplo de energia fotoinduzida. A riboflavina após absorção de energia na forma de luz, atinge o seu estado excitado singleto e posteriormente por meio de um cruzamento intersistema passa para seu estado excitado tripleto. Então, o oxigênio molecular que no estado fundamental é $^3\text{O}_2$, estado tripleto, é promovido ao estado singleto $^1\text{O}_2$ por meio de transferência de energia tripleto-tripletto, FIGURA 43.

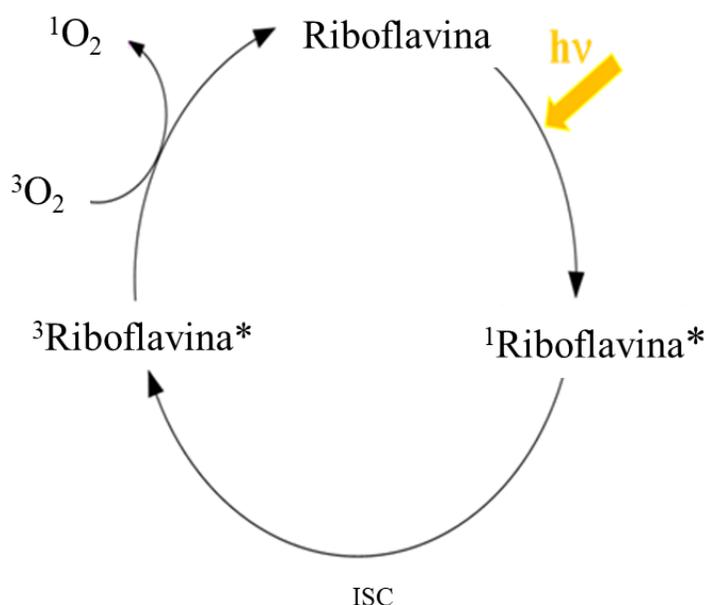


FIGURA 43: Esquema de geração de oxigênio singleto riboflavina foto excitada.

A desativação do $^1\text{O}_2$ foi realizada para os complexos $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$, FIGURA 44, pois os dois complexos sintetizados apresentaram atividade antioxidante por meio dos testes realizados anteriormente.

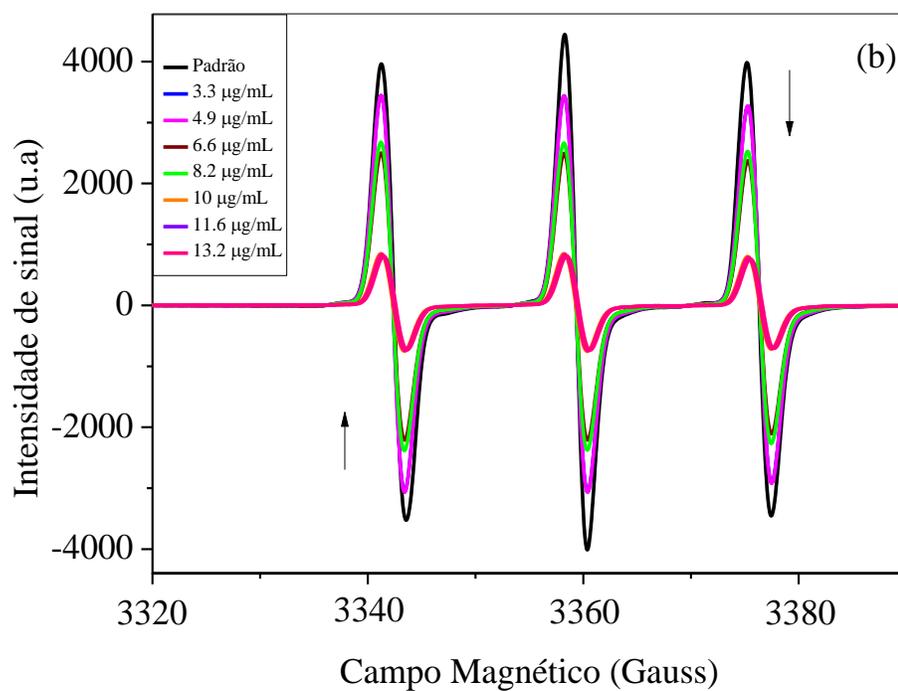
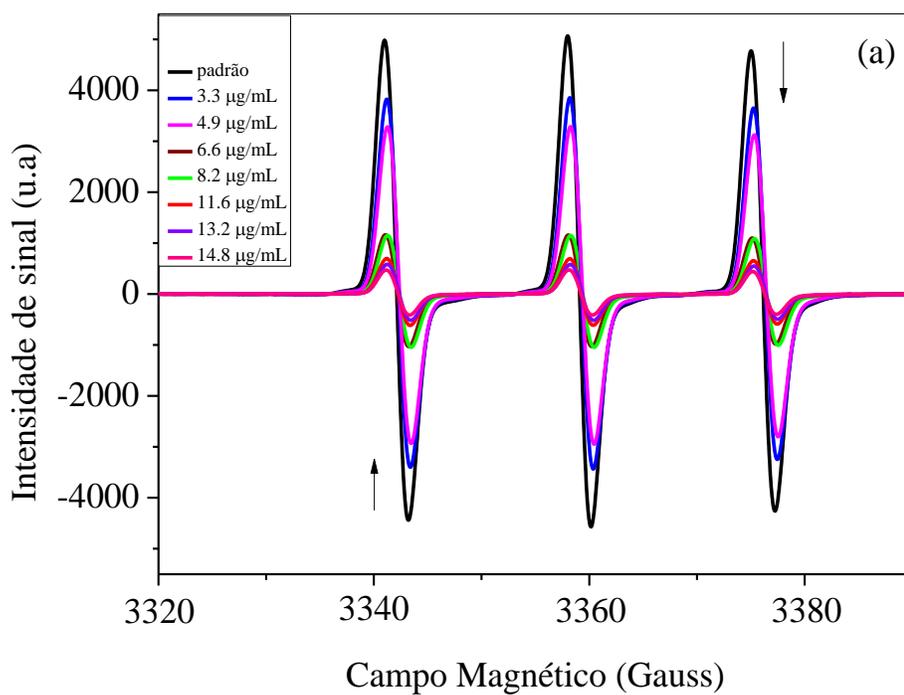


FIGURA 44: Espectros de EPR do aduto Oxo-TEMPO em variadas concentrações do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ (a) e $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ (b).

De acordo com a FIGURA 44, observa-se uma diminuição na intensidade de sinal nas hiperfinas características da espécie paramagnética TEMPO conforme adiciona-se maiores concentrações dos complexos em estudo. Quando se utiliza o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ para inibição do $^1\text{O}_2$ nota-se uma ligeira queda de intensidade de sinal conforme adicionamos maiores concentração de composto ($3,3 - 4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto que ao adicionarmos uma concentração de $6,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ a queda de intensidade de sinal é abrupta, caindo mais que 70 % de intensidade e entre as concentrações de ($11,6 - 14,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) temos uma estabilização de inibição de sinal.

No caso do complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ observa-se um comportamento diferente, ao adicionarmos o composto nas concentrações ($3,3 - 4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) percebe-se uma diminuição não muito acentuada na intensidade de sinal, o outro par de concentração ($6,6 - 8,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) uma nova diminuição de intensidade de sinal com intensidade moderada, e finalmente ao adicionarmos o composto em concentrações superiores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ observa-se um decréscimo intenso de sinal, o que nos leva a conclusão de que o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$ apresenta uma inibição de $^1\text{O}_2$, porém quando em concentrações superiores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o complexo $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ em concentrações superiores a $6,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ já apresenta uma ação inibitória bastante pronunciada.

Sendo assim, pode-se inferir que o $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{caf})]^+$ por precisar de uma concentração menor que o $[\text{Mg}(\text{phen})_2(\text{dmaca})]^+$, seja mais eficiente como inibidor de $^1\text{O}_2$.

4.13 Citotoxicidade

A avaliação da toxicidade dos compostos foi realizada utilizando células de melanoma humano (A375). O melanoma é um câncer de pele que surge por meio de transformações de melanócitos e frequentemente caracterizado pela resistência a citotoxinas, o que contribui para a alta taxa de mortalidade em pacientes. Portanto é importante procurar novas fontes de agentes anticancerígenos que exerçam citotoxicidade ativa contra células de melanoma.

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de redução do MTT e na faixa de concentração testada não se observou um efeito inibitório significativo no crescimento das células A375, FIGURA 45.

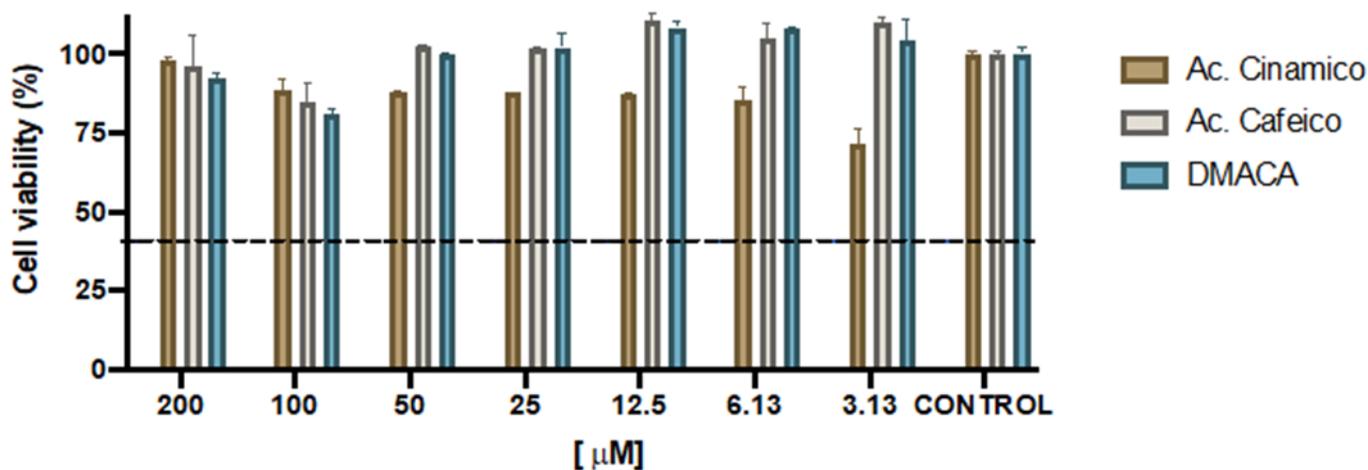


FIGURA 45: Ensaios MTT para estimar a citotoxicidade dos ligantes livres em células de melanoma.

Portanto, os ligantes livres nas concentrações de 3,13 µM a 200 µM não são citotóxicos para a linhagem celular de melanoma A375, com exceção ao ligante livre ácido cinâmico, que apresentou uma leve citotoxicidade frente a

linhagem celular de melanoma A375. Entretanto, essa citotoxicidade em torno de 25 % na concentração de 3.13 μM e ao aumentarmos a concentração do ácido cinâmico, nós não observamos um aumento na citotoxicidade.

Entretanto, nos ensaios para os complexos sintetizados, observou-se uma inibição significativa em relação à viabilidade celular próximo a 50 % quando a concentração dos complexos adicionados estão acima de 12,5 μM , FIGURA 46.

Portanto, a complexação dos compostos fenólicos com o Mg(II) e 1,10-fenantrolina favoreceu a citotoxicidade em comparação com os ligantes livres e os complexos apresentam citotoxicidade relevantes para combater as células de melanoma humana A375.

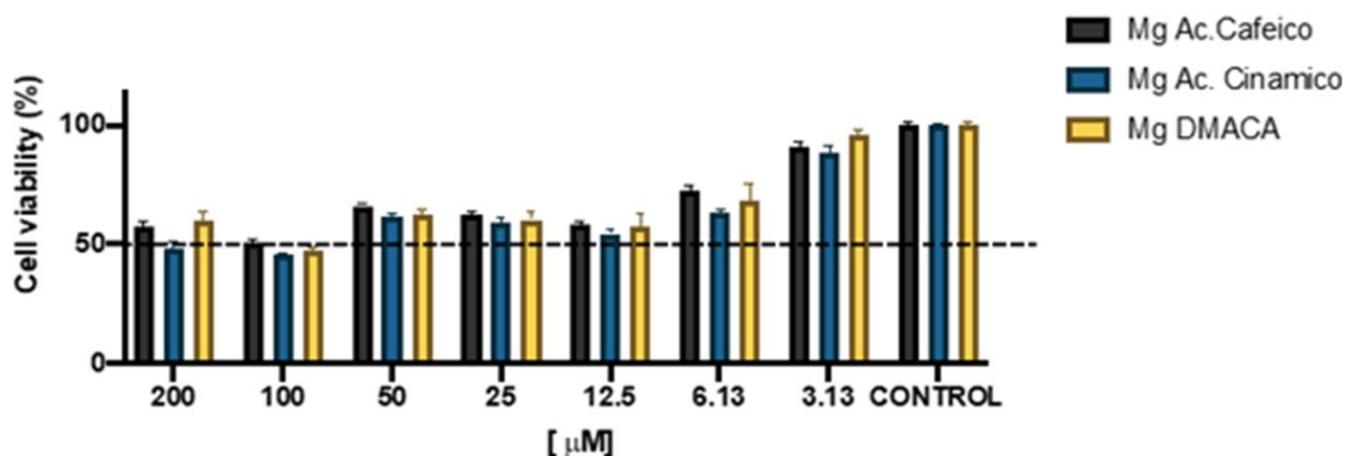


FIGURA 46: Ensaios MTT para estimar a citotoxicidade dos complexos em células de melanoma humano.

5 CONCLUSÃO

Os complexos propostos foram sintetizados e caracterizados;

A complexação do ácido cafeico apresentou atividade antioxidante nos testes *in vitro*;

Por meio dos testes de inibição de radicais superóxido e oxigênio singlete, observou-se a melhora na atividade antioxidante quando o ligante dmaca é complexado;

O ácido cinâmico tanto livre quanto complexado não apresenta potencial atividade antioxidante;

Tanto o ligante livre ácido cafeico quanto o complexo não apresentaram poder de inibição significativo da enzima acetilcolinesterase;

A complexação dos compostos fenólicos favoreceu a citotoxicidade em comparação com os ligantes livres e apresentam citotoxicidade relevantes para combater as células de melanoma humana A375.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ELIAS, P.M. *The skin barrier as an innate immune element*. in *Seminars in immunopathology*. 2007: Springer.
2. HARMAN, D.J.S.S.S.K. "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry". *Science's SAGE KE*, **2002** (37): 14, 2002.
3. FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S. & VOORHEES, J.J.J.A.O.D. "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging". *Archives of dermatology*, **138** (11): 1462, 2002.
4. YAAR, M.; ELLER, M.S. & GILCHREST, B.A. *Fifty years of skin aging*. in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2002: Elsevier.
5. CHUNG, C. & REILLY, S.J.A.J.O.H.-S.P. "Trametinib: a novel signal transduction inhibitor for the treatment of metastatic cutaneous melanoma". **72** (2): 101, 2015.
6. VEJSELI, H., Značaj scintigrafije limfnog čvora stražara kod malignog melanoma trupa. - Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Medicine Osijek, 2020. p.
7. PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M. & MICOL, V.J.N. "Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies". **10** (4): 403, 2018.
8. MARCHI, S.; GIORGI, C.; SUSKI, J.M.; AGNOLETTI, C.; BONONI, A.; BONORA, M.; DE MARCHI, E.; MISSIROLI, S.; PATERGNANI, S. & POLETTI, F.J.J.O.S.T. "Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging". *Journal of signal transduction*, **2012** 2012.
9. RIDLEY, A.J.; WHITESIDE, J.R.; MCMILLAN, T.J. & ALLINSON, S.L.J.I.J.O.R.B. "Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis". *International journal of radiation biology*, **85** (3): 177, 2009.
10. MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C. & DE CASTRO, I.N.J.C.B. "Antioxidant enzymes and human diseases". *Clinical biochemistry*, **32** (8): 595, 1999.
11. FINKEL, T. & HOLBROOK, N.J.J.N. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature*, **408** (6809): 239, 2000.
12. KANT, V.; GOPAL, A.; PATHAK, N.N.; KUMAR, P.; TANDAN, S.K. & KUMAR, D.J.I.I. "Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats". *International immunopharmacology* **20** (2): 322, 2014.

13. NIMSE, S.B. & PAL, D.J.R.A. "Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms". *RSC advances*, **5** (35): 27986, 2015.
14. PACURARI, M.; YIN, X.J.; ZHAO, J.; DING, M.; LEONARD, S.S.; SCHWEGLER-BERRY, D.; DUCATMAN, B.S.; SBARRA, D.; HOOVER, M.D. & CASTRANOVA, V.J.E.H.P. "Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF- κ B, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells". *Environmental health perspectives*, **116** (9): 1211, 2008.
15. RITTIÉ, L. & FISHER, G.J.J.A.R.R. "UV-light-induced signal cascades and skin aging". *Ageing research reviews*, **1** (4): 705, 2002.
16. HALLIWELL, B.J.P.P. "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life". *Plant physiology*, **141** (2): 312, 2006.
17. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M., *Free radicals in biology and medicine* 2015, Oxford University Press, USA. p.
18. AMIRA, A.M.J.R.J.O.I. "Oxidative stress and disease". *Research Journal of Immunology*, **3** (2): 129, 2010.
19. DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N.J.N., METABOLISM & DISEASES, C. "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress". *Nutrition, metabolism cardiovascular diseases* **15** (4): 316, 2005.
20. EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M. & COOKE, M.S.J.M.R.R.I.M.R. "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance". *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **567** (1): 1, 2004.
21. SIES, H.; MURPHY, M.E.J.J.O.P. & BIOLOGY, P.B. "Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage". *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology* **8**(2): 211, 1991.
22. STEINBERG, D.J.T.L. "Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing?". *The Lancet*, **346** (8966): 36, 1995.
23. BABCOCK, G.T.J.P.O.T.N.A.O.S. "How oxygen is activated and reduced in respiration". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96** (23): 12971, 1999.
24. BRAND, M.D.; AFFOURTIT, C.; ESTEVES, T.C.; GREEN, K.; LAMBERT, A.J.; MIWA, S.; PAKAY, J.L.; PARKER, N.J.F.R.B. & MEDICINE "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins". *Free Radical Biology Medicine* **37** (6): 755, 2004.

25. CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.D. & AUGUSTO, O.J.Q.N. "Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas". *Química Nova* **30** (2): 441, 2007.
26. FERREIRA, A. & MATSUBARA, L.J.R.D.A.M.B. "Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress". *Revista da Associação Médica Brasileira*, **43** (1): 61, 1997.
27. HANSON, R.J.B.E. "The role of ATP in metabolism". *Biochemical Education*, **17** (2): 86, 1989.
28. KARLIN, K.D.J.S. "Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models". *Science*, **261** (5122): 701, 1993.
29. KOURY, J.C. & DONANGELO, C.M.J.R.D.N. "Zinco, estresse oxidativo e atividade física". **16** (4): 433, 2003.
30. MALMSTROM, B.G.J.A.R.O.B. "Enzymology of oxygen". *Annual review of biochemistry*, **51** (1): 21, 1982.
31. SHEU, S.-S.; NAUDURI, D. & ANDERS, M.J.B.E.B.A.-M.B.O.D. "Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction". *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease*, **1762** (2): 256, 2006.
32. FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; MURAKAMI, Y. & KADOMA, Y.J.A.I.T.E. "Dimerization, ROS formation, and biological activity of o-methoxyphenols". *Arch Immunol Ther Exp*, **53**: 28, 2005.
33. NICOLESCU, A.C.; ZAVORIN, S.I.; TURRO, N.J.; REYNOLDS, J.N. & THATCHER, G.R.J.C.R.I.T. "Inhibition of lipid peroxidation in synaptosomes and liposomes by nitrates and nitrites". *Chemical research in toxicology* **15** (7): 985, 2002.
34. WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F.J.B.S.I.O. & PRODUCTS, F. "Antioxidants: science, technology, and applications". *Bailey's industrial oil fat products* 2005.
35. KRUMOVA, K.; FRIEDLAND, S. & COSA, G.J.J.O.T.A.C.S. "How lipid unsaturation, peroxy radical partitioning, and chromanol lipophilic tail affect the antioxidant activity of α -tocopherol: Direct visualization via high-throughput fluorescence studies conducted with fluorogenic α -tocopherol analogues". *Journal of the American Chemical Society*, **134** (24): 10102, 2012.
36. SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T. & SALTMARSH, M.J.T.A.J.O.C.N. "Polyphenols: antioxidants and beyond". *The American journal of clinical nutrition* **81** (1): 215S, 2005.

37. SIDDAIAH, V.; RAO, C.V.; VENKATESWARLU, S.; KRISHNARAJU, A.V.; SUBBARAJU, G.V.J.B. & CHEMISTRY, M. "Synthesis, stereochemical assignments, and biological activities of homoisoflavonoids". *Bioorganic medicinal chemistry* **14** (8): 2545, 2006.
38. BENGMARK, S.J.C.N. "Acute and "chronic" phase reaction—a mother of disease". *Clinical Nutrition*, **23** (6): 1256, 2004.
39. BAE, J.Y.; LIM, S.S.; KIM, S.J.; CHOI, J.S.; PARK, J.; JU, S.M.; HAN, S.J.; KANG, I.J.; KANG, Y.H.J.M.N. & RESEARCH, F. "Bog blueberry anthocyanins alleviate photoaging in ultraviolet-B irradiation-induced human dermal fibroblasts". *Molecular nutrition food research*, **53** (6): 726, 2009.
40. BARBULOVA, A.; APONE, F. & COLUCCI, G.J.C. "Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients". *Cosmetics*, **1** (2): 94, 2014.
41. BARBULOVA, A.; COLUCCI, G. & APONE, F.J.C. "New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients". *Cosmetics*, **2** (2): 82, 2015.
42. KANTOH, K.; ONO, M.; NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; HASHIMOTO, K.; SAKAGAMI, H. & WAKABAYASHI, H.J.I.V. "Hormetic and anti-radiation effects of tropolone-related compounds". *In Vivo*, **24** (6): 843, 2010.
43. RIBEIRO, A.S.; ESTANQUEIRO, M.; OLIVEIRA, M.B. & SOUSA LOBO, J.M.J.C. "Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products". *Cosmetics*, **2** (2): 48, 2015.
44. CHOI, S.-Y.; HWANG, J.-H.; KO, H.-C.; PARK, J.-G. & KIM, S.-J.J.O.E. "Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- κ B and ROS production in LPS-activated RAW 264.7 cells". *Journal of ethnopharmacology*, **113** (1): 149, 2007.
45. FRYDOONFAR, H.; MCGRATH, D. & SPIGELMAN, A.J.C.D. "The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid Naringenin". *Colorectal Disease*, **5** (2): 149, 2003.
46. SAEWAN, N. & JIMTAISONG, A.J.J.O.C.D. "Natural products as photoprotection". *Journal of cosmetic dermatology*, **14** (1): 47, 2015.
47. BARREIRO, E.; DASILVA, J. & FRAGA, C.J.Q.N. "Basic notions of drug metabolism". *Química nova*, **19** (6): 641, 1996.
48. HIGDON, J.V. & FREI, B. "Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003.
49. CARDOSO, C.R.; DE AGUIAR, I.; CAMILO, M.R.; LIMA, M.V.; ITO, A.S.; BAPTISTA, M.S.; PAVANI, C.; VENÂNCIO, T. & CARLOS,

- R.M.J.D.T. "Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono-and bi-dentate histamine ligand". *Dalton Transactions*, **41** (22): 6726, 2012.
50. CARLOS, R.M.; CARDOSO, D.R.; CASTELLANO, E.E.; OSTI, R.Z.; CAMARGO, A.J.; MACEDO, L.G. & FRANCO, D.W.J.J.O.T.A.C.S. "Reactivity of radicals generated on irradiation of trans-[Ru (NH₃)₄ (NO₂) P (OEt)₃](PF₆)". *Journal of the American Chemical Society*, **126** (8): 2546, 2004.
51. DORO, F.G.; PEPE, I.M.; GALEMBECK, S.E.; CARLOS, R.M.; DA ROCHA, Z.N.; BERTOTTI, M. & TFOUNI, E.J.D.T. "Reactivity, photolability, and computational studies of the ruthenium nitrosyl complex with a substituted cyclam fac-[Ru (NO) Cl₂ (κ³ N₄, N₈, N₁₁ (1-carboxypropyl) cyclam)] Cl · H₂O". *Dalton Transactions*, **40** (24): 6420, 2011.
52. ZOUBOULIS, C.C.; GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A.I.; THEODORIDIS, A.; ELEWA, R. & MAKRANTONAKI, E.J.C.I.D. "Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment". **37** (4): 365, 2019.
53. GUARATINI, T.; CALLEJON, D.R.; PIRES, D.C.; LOPES, J.N.C.; LIMA, L.M.; GIANNELLA NETO, D.; SUSTOVICH, C. & LOPES, N.P.J.Q.N. "Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa". **32** (3): 717, 2009.
54. KANASHIRO, A.; KABEYA, L.; POLIZELLO, A.; LOPES, N.; LOPES, J.; LUCISANO-VALIM, Y.J.P.R.A.I.J.D.T.P. & DERIVATIVES, T.E.O.N.P. "Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes". **18** (1): 61, 2004.
55. OLIVEIRA, R.M.; DE SOUZA DANIEL, J.F.; DE AGUIAR, I.; SILVA, M.F.D.G.F.; FERNANDES, J.B. & CARLOS, R.M.J.J.O.I.B. "Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes". **129**: 35, 2013.
56. MAULIK, D.; ZANELLI, S.; NUMAGAMI, Y.; OHNISHI, S.T.; MISHRA, O.P. & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.J.B.R. "Oxygen free radical generation during in-utero hypoxia in the fetal guinea pig brain: the effects of maturity and of magnesium sulfate administration". **817** (1-2): 117, 1999.
57. FRITZ, K.; MISHRA, O. & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.J.N. "Mg²⁺-dependent modification of the N-methyl-D-aspartate receptor

- following graded hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets". **92** (2): 685, 1999.
58. INGLEZ, S.D.; LIMA, F.C.; SILVA, A.B.; SIMIONI, A.R.; TEDESCO, A.C.; DANIEL, J.F.; LIMA-NETO, B.S. & CARLOS, R.M.J.I.C. "Photoinduced Electron-Transfer Processes Based on Novel Bipyridine–Ru (II) Complex: Properties of cis-[Ru (2, 2 '-bipyridine) 2 (5, 6-bis (3-amidopyridine)-7-oxanorbornene)](PF6) 2 and cis-[Ru (2, 2 '-bipyridine) 2 (3-aminopyridine) 2](PF6) 2 Complexes". *Inorganic chemistry*, **46** (14): 5744, 2007.
59. OLIVEIRA, R.M.; DE SOUZA DANIEL, J.F. & CARLOS, R.M.J.J.O.M.S. "Synthesis, spectroscopic characterization and biological activity of cis-[Ru (hesperidin)(1, 10'-phenanthroline) 2](PF6) complex". *Journal of Molecular Structure*, **1031**: 269, 2013.
60. OLIVEIRA, R.M.; DE SOUZA DANIEL, J.F.; DE AGUIAR, I.; SILVA, M.F.D.G.F.; FERNANDES, J.B. & CARLOS, R.M.J.J.O.I.B. "Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes". *Journal of inorganic biochemistry*, **129**: 35, 2013.
61. SILVA, D.E.; CALI, M.P.; PAZIN, W.M.; CARLOS-LIMA, E.; SALLES TREVISAN, M.T.; VENANCIO, T.; ARCISIO-MIRANDA, M.; ITO, A.S. & CARLOS, R.M.J.J.O.M.C. "Luminescent Ru (II) phenanthroline complexes as a probe for real-time imaging of A β self-aggregation and therapeutic applications in Alzheimer's disease". *Journal of medicinal chemistry*, **59** (19): 9215, 2016.
62. GILCHREST, B.J.D.N. "Skin aging and photoaging". *Dermatology nursing*, **2** (2): 79, 1990.
63. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR, V. & FEATHERSTONE, R.M.J.B.P. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochemical pharmacology*, **7** (2): 88, 1961.
64. MOSMANN, T.J.J.O.I.M. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of immunological methods*, **65** (1-2): 55, 1983.
65. SOUZA, A.A.D. & LAVERDE JR., A. "Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY %J Química Nova". *Química Nova*, **25**: 1022, 2002.
66. MARCHI, R.C.; SILVA, E.S.; SANTOS, J.J.; GUILOSKI, I.C.; DE JESUS, H.C.R.; DE AGUIAR, I.; KOCK, F.V.; VENÂNCIO, T.; DA SILVA, M.F.T.G. & FERNANDES, J.O.B.J.A.O. "Synthesis, Characterization,

- and Low-Toxicity Study of a Magnesium (II) Complex Containing an Isovanillate Group". *ACS omega*, **5** (7): 3504, 2020.
67. GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F.S. & SPINELLI, A. "Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5 % Journal of the Brazilian Chemical Society". *Journal of the Brazilian Chemical Society* **13**: 332, 2002.
68. SMITH, R.M. & MARTELL, A.E., *Critical stability constants: inorganic complexes* 1976, Springer. p.
69. MAKHOTKINA, O. & KILMARTIN, P.A.J.A.C.A. "The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide". *Analytica Chimica Acta* **668** (2): 155, 2010.
70. NWIDU, L.L.; ELMORSY, E.; APRIOKU, J.S.; SIMINIALAYI, I. & CARTER, W.G.J.M. "In vitro anti-cholinesterase and antioxidant activity of extracts of Moringa oleifera plants from Rivers State, Niger Delta, Nigeria". *Medicines*, **5** (3): 71, 2018.
71. FEITOSA, C.; FREITAS, R.; LUZ, N.; BEZERRA, M. & TREVISAN, M. "Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants %J Brazilian Journal of Biology". *Brazilian Journal of Biology* **71**: 783, 2011.
72. MORAIS, S.M.; LIMA, K.S.B.; SIQUEIRA, S.M.C.; CAVALCANTI, E.S.B.; SOUZA, M.S.T.; MENEZES, J.E.S.A. & TREVISAN, M.T.S. "Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas %J Revista Brasileira de Plantas Medicinais". *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **15**: 575, 2013.
73. CAMPS, P.; FORMOSA, X.; GALDEANO, C.; GÓMEZ, T.; MUNOZ-TORRERO, D.; SCARPELLINI, M.; VIAYNA, E.; BADIA, A.; CLOS, M.V. & CAMINS, A.J.J.O.M.C. "Novel donepezil-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced β -amyloid aggregation". *Journal of medicinal chemistry*, **51** (12): 3588, 2008.
74. MARCO-CONTELLES, J.; LEÓN, R.; DE LOS RÍOS, C.; SAMADI, A.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; HUERTAS, O.; BARRIL, X.; LUQUE, F. & RODRÍGUEZ-FRANCO, M.J.J.M.C. "Carreiras Mdo. C., Villarroya M. Tacripyrines, the first tacrine-dihydropyridine hybrids, as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease". *J. Med. Chem.*, **52** (9): 2724, 2009.

75. SMULDERS, C.J.; BUETERS, T.J.; VAN KLEEF, R.G.; VIJVERBERG, H.P.J.T. & PHARMACOLOGY, A. "Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase". *Toxicology applied pharmacology* **193** (2): 139, 2003.