

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS



MARINA COSTA RAMOS

CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO DE 1,10 – FENANTROLINA E SERINA COMPLEXADO COM COBRE (II) PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTITUMORAL.

IMPERATRIZ – MA 2019

MARINA COSTA RAMOS

CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO DE 1,10 – FENANTROLINA E SERINA COMPLEXADO COM COBRE (II) PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTITUMORAL.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Área de concentração: Ciências Exatas e da Terra

Orientador: Prof. Dr. Adenilson Oliveira dos Santos

IMPERATRIZ – MA 2019

MARINA COSTA RAMOS

CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO DE 1,10 – FENANTROLINA E SERINA COMPLEXADO COM COBRE (II) PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTITUMORAL

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Área de concentração: Ciências Exatas e da Terra

Aprovada em: 27 / Dezembro / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Adenilson Oliveira dos Santos (Orientador) Universidade Federal do Maranhão – UFMA

> Prof. Dr. Francisco Ferreira de Sousa Universidade Federal do Pará – UFPA

Dr. Guilherme Calligaris de Andrade Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais – CNPEM - LNLS

Aos meus pais, Maria Izaura Costa Ramos e Thomé Ramos Filho pelo incentivo e apoio, por acreditarem nesse sonho e na minha capacidade de realizá-lo mesmo diante dos desafios e dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me abençoar e iluminar os meus passos a cada dia, me dando forças para superar os obstáculos, sem Ele nada disto teria sido possível. Obrigada meu Deus por esta vitória.

Aos meus pais, Thomé Ramos Filho e Maria Izaura Costa Ramos, meu infinito agradecimento. Vocês são a minha referência, meu porto seguro. Obrigada por toda confiança, por me ensinarem a lutar pelos meus ideais, pelos conselhos e amor incondicional.

Ao meu irmão Rafael Costa Ramos, pela força e ajuda quando preciso.

A toda minha família, pelo apoio e momentos de descontração.

Ao meu namorado Danilo Pereira Cortez, por seu amor, carinho, apoio, compreensão e paciência nos momentos de ausência e estresse. Obrigada pela confiança.

Ao Prof. Dr. Adenilson Oliveira dos Santos, pela oportunidade de ser sua orientanda, pela confiança, por todos os ensinamentos e contribuições para o meu crescimento profissional, um exemplo como orientador e pesquisador. Obrigada pela amizade, pelas conversas no laboratório, pelos sorrisos e momentos de descontração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da UFMA. Obrigada pelos ensinamentos em sala de aula e nos laboratórios.

Ao Prof. Dr. Francisco Ferreira de Souza, pela oportunidade de realizar a medida de Espectroscopia Raman na UFPA.

Ao Prof. Dr. Alan Silva de Menezes, pela medida de DRX realizada.

A todos os alunos da UFMA que contribuíram para a realização deste trabalho, que fizeram ou ainda fazem parte de todos os laboratórios. Obrigada por toda ajuda.

A todos que fazem parte do melhor laboratório do programa LDRX, Leonardo Sobreira, Jefferson Santos, Ian Felipe, Jacivan Júnior, Jayson, Jailton Romão, Kamila Abreu, Rayssa Rafaella. Minhas tardes com vocês são as melhores, uma família que ganhei. Obrigada por tudo.

Ao meu amigo João Gomes, sem você não teria conseguido. Obrigada pelas contribuições, ensinamentos, conversas, conselhos, risadas, caracterizações e amizade. De verdade, muito obrigada.

Ao meu amigo Gleison Lopes, meu companheiro de estudos. Obrigada amigo pela sua contribuição, por confiar em mim, pelo carinho e cuidado. Passamos por vários momentos juntos tanto na UFMA, como fora dela, obrigada por sua amizade.

A minha amiga Carliana Rodrigues, mais uma cearense que ganhou meu carinho. Pouco tempo de convivência, mas parece que são anos. Obrigada pelo incentivo, pelas saídas sempre divertidas, pelas conversas e apoio, vou levar para sempre.

A todos que fizeram as disciplinas acadêmicas, obrigada por estarem junto comigo nos momentos de estudos, vocês foram essenciais, em especial ao Raychiman Bezerra e Emanuella Fabrícia, que me ajudaram quando entrei no programa, obrigada por todo apoio.

A todos os servidores e funcionários da UFMA, por estarem dispostos a ajudar quando solicitados. Em especial a Tia Antônia e Tia Katia, pelo carinho e ajuda.

A UFMA e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais.

A todos que contribuíram de alguma forma no processo de desenvolvimento desse trabalho.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação. (Simone de Beauvoir)

RESUMO

Íons de metais de transição como o cobre têm sido alvo de estudos e vêm ganhando espaço no meio científico, tendo como finalidade desenvolver novas drogas com propriedades farmacológicas significativas para serem utilizados especialmente em terapias do câncer. O câncer é uma doenca de diferentes diagnósticos com dificuldade de tratamento devido à diversidade e complexidade de seus tumores. Dados alarmantes são apresentados em virtude do número de mortes associadas a esta patologia. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo a síntese e o crescimento do cristal ternário de 1,10- fenantrolina e serina complexado com cobre (II), assim como o estudo das propriedades físicas e biológicas tendo em vista sua aplicação em atividade antitumoral. Para o processo de cristalização utilizou-se o método da evaporação lenta do solvente e o cristal foi obtido após sete dias. O cristal foi caracterizado pelas técnicas de difração de raios X (DRX) em conjunto com o refinamento Rietveld, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, análise termogravimétrica (TG), análise térmica diferencial (DTA), magnetização, teste de solubilidade e avaliação da atividade antitumoral in vitro. Através da DRX em temperatura ambiente (25 °C/298K), verificou-se que o cristal apresenta estrutura triclínica, grupo espacial P1 e parâmetros de rede: a = 7,6358(3) Å, b = 10,0523(4) Å, c =12,0204(7) Å, $\alpha = 97,43(3)^\circ$, $\beta = 106,84(3)^\circ$, $\gamma = 108,75(3)$, contendo 2 moléculas por célula unitária. As análises de MEV e EDS mostram defeitos na superfície do cristal e a composição elementar da amostra, respectivamente. Os espectros Raman e FTIR evidenciaram a complexação do íon Cu²⁺ com as moléculas orgânicas. A partir das técnicas termoanalíticas verificou-se a estabilidade térmica do cristal até 60 °C. A DRX em função da temperatura (303 a 493 K) mostrou a transformação de fase do material de sua forma hidratada para anidra, confirmando a saída de água do material. Usando o método Le Bail para refinamento da estrutura determinou-se que o material permaneceu com estrutura triclínica P1. A espectroscopia Raman em função da temperatura (294 a 433 K) confirmou a transformação de fase detectada pela DRX. Os resultados das análises magnetização revelaram que o cristal se trata de um material com propriedades paramagnéticas. A atividade antitumoral do sistema cristalino foi confirmada por meio de teste de citotóxicos em linhagem celular HCT-116 apresentando uma IC₅₀= 2,14 μ M superior ao complexo da cisplatina (IC₅₀ = 8,3 μ M). O cristal apresentou um perfil de solubilidade aquosa considerado bom quando comparado com fármacos utilizados no tratamento do câncer, atingindo 21,61 mg/ml em 180 minutos.

Palavras-chave: Cobre. Câncer. Cristal. Atividade Antitumoral.

ABSTRACT

Transition metal ions such as copper have been the subject of studies and have been gaining ground in the scientific field, aiming to develop new drugs with significant pharmacological properties to be used especially in cancer therapies. Cancer is a disease of different diagnoses that is difficult to treat due to the diversity and complexity of its tumors, alarming data are presented due to the number of deaths associated with this pathology. Therefore, this study aimed the 1,10-Phenantroline and Serine complexed with Copper (II) ternary crystal synthesis, as well as the study of the physico-chemical properties in view of their application in antitumor activity. The sample was synthetized by slow evaporation solvent method was used and the crystal was obtained after seven days. The crystal was characterized by X-ray Diffraction (XRD) with Rietveld refinement, Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersion X-Ray Spectroscopy (EDS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)), Raman Spectroscopy, Thermogravimetric Analysis (TG), Differential Thermal Analysis (DTA), Magnetization, antitumor activity evaluation and Solubility Test. XRD measurements at room temperature, showed that the crystal have a triclinic structure, space group P1 and lattice parameters: a = 7.6358 (3) Å, b = 10.0523 (4) Å, c = 12.0204 (7) Å, and angles $\alpha = 97.43$ (3) °, $\beta = 106.84$ (3) °, $\gamma = 108.75$ (3), containing 2 molecules for unit cell. The SEM and EDS analyzes showed interfacial defects on the crystalline surface and the elemental composition of the sample, respectively. The Raman and FTIR spectra confirmed the complexation of the Cu 2+ ion with the organic molecules. From the thermoanalytical techniques the thermal stability of the crystal up to 60 °C was verified. The XRD as a function of temperature (303 to 493 K) showed the phase transformation of the material from its hydrated to anhydrous form, forming the water outlet of the material. Using the Le Bail method for refinement of the structure determined that the material remained with structure triclinic P1. Raman spectroscopy with temperature variation (294 to 433 K) confirmed the phase transformation detected by XRD. Magnetization analysis revealed that the crystal is a material with paramagnetic properties. The antitumor activity of the crystalline system was confirmed by cytotoxic assays in HCT-116 tumor cell line with an IC₅₀ = 2.14 μ M higher than the cisplatin complex (IC₅₀ = 8.3 μ M). The crystal showed an aqueous solubility profile considered good when compared to drugs used to treat cancer, reaching 21.61 mg / mL in 180 minutes.

Keywords: Copper. Cancer. Crystal. Antitumor.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

✤ Participação em Eventos Científicos:

- 58º Congresso Brasileiro de Química, São Luís MA, 2018.
- XVIII Brazil Materials Research Society (B-MRS) Meeting. Balneário Camboriú – SC, 2019.
- 59º Congresso Brasileiro de Química, João Pessoa PB, 2019.

***** Resumos publicados em anais de congresso:

- RAMOS, M. C.; OLIVEIRA NETO, J. G.; SANTOS, A. O. Produção de farinha de amendoim para utilização como adsorvente visando a aplicação na remoção de corantes orgânicos. 59° Congresso Brasileiro de Química, João Pessoa – PB, 2019.
- OLIVEIRA NETO, J. G.; ABREU, K. R.; RODRIGUES, J. A. O.; REIS, I. F. S.; SILVA, C. R; RAMOS, M. C.; OLIVEIRA, R. R. S. C.; SOUSA, F. F.; SANTOS, A. O. Estudo vibracional por Espectroscopia Raman do cristal de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II) para uso em antitumorais. VI Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. Belém – PA, 2019.
- RAMOS, M. C.; OLIVEIRA NETO, J. G.; SANTOS, G. C.; REIS, I. F. S.; SANTOS, J. C.; SANTOS, A. O. Synthesis and Characterization of 1,10phenantroline and Serine complexed with Copper (II). XVIII Brazil MRS Meeting. Balneário Camboriú – SC, 2019.
- REIS, I. F. S.; OLIVEIRA NETO, J. G.; ABREU, K. R. RAMOS, M. C.; SANTOS, A. O. Synthesis, Structural and Thermal characterization of Iron (II) complex with 1,10-Phenanthroline and Malonic Acid for Antitumor Application. XVIII Brazil MRS Meeting. Balneário Camboriú – SC, 2019.
- SANTOS, G. C.; OLIVEIRA NETO, J. G.; REIS, I. F. S.; RAMOS, M. C.; ABREU, K. R.; SILVA, C. R.; VIANA, J. R.; SANTOS, A. O. Complex of L-Glutamic Acid and 1,10-Phenanthroline with Copper (II) for antitumor application. XVIII Brazil MRS Meeting. Balneário Camboriú – SC, 2019.
- OLIVEIRA NETO, J. G.; ABREU, K. R.; REIS, I. F. S.; RAMOS, M. C.; REIS, a. S.; SANTOS, A. O. Synthesis and characterization of copper (II) complex with 1,10-Phenanthroline and Glycine: An apoptosis inductor. XVIII Brazil MRS Meeting. Balneário Camboriú – SC, 2019.
- RAMOS, M. C.; OLIVEIRA NETO, J. G.; SANTOS, A. O. Crescimento e Estudo das propriedades estruturais e térmicas do cristal ternário de Cu (II) com 1,10-Fenantrolina e Serina para aplicação antitumoral. 58° Congresso Brasileiro de Química, São Luís – MA, 2018.
- OLIVEIRA NETO, J. G.; RAMOS, M. C.; RODRIGUES, J. O.; ABREU, K. R.; REIS, I. F. S.; SOUSA, F. F.; SANTOS, A. O. Estudo das Propriedades Físico-Químicas do Cristal de 1,10-Fenantrolina e Glicina complexado com íons Cu²⁺

para o uso em Antitumorais. 58º Congresso Brasileiro de Química, São Luís – MA, 2018.

- Patentes submetidas:
 - RAMOS, M. C.; OLIVEIRA NETO, J. G.; SANTOS, J. C.; SILVA, C. R; SANTOS, A. O. *Filme biodegradável com propriedade antitumoral e seu processo de obtenção*. Universidade Federal do Maranhão, 2019
 - OLIVEIRA NETO, J. G.; RAMOS, M. C.; SILVA, C. R; RODRIGUES, J. A. O.; REIS, I. F. S.; OLIVEIRA, R. R. S. C.; SANTOS, J. C.; ABREU, K. R.; SANTOS, A. O. Processo metodológico para o preparo do agente antitumoral de Cu (II) com glicina e 1,10-fenantrolina na forma cristalina disperso em quitosana para obtenção de filmes inorgânicos biodegradáveis. Universidade Federal do Maranhão, 2019.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Áreas de estudo da química inorgânica medicinal	3					
Figura 2: Multiplicação das células e surgimento do câncer.	5					
Figura 3: Comparação da sobrevida de 2 anos após tratamento com hipertermia e quimiote	rapia					
e quimioterapia sozinha. Os agentes usados foram Cisplatina, Mitomicina, Bleomicin	a. A					
hipertermia foi aplicada entre 40 e 60 minutos.	7					
Figura 4: Resumo dos resultados obtidos pela Sociedade Japonesa de Hipertermia utili						
Figure 5. Depresentação acquemético de possíveis modos de interneão complexo DNA	0					
Figura 5: Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA.	9 12					
Figura 6: Esquema do processo de nucleação para cristais.	_ 13 _ 14					
Figura /: Curva de solubilidade de um material impotenco.	_ 14 _ 16					
Figura 8: Esquema hustrativo do funcionamento do tudo de Katos A	$-\frac{10}{17}$					
Figura 9: Representação da Difiação de Raios A por meio de um cristal.	$-\frac{1}{21}$					
Figura IO: Elettos gerados da interação de um feixe de eletrons com um aivo solido.	$-\frac{21}{22}$					
Figura 11: Movimentos vibracionais dos atomos.	$-\frac{23}{24}$					
Figura 12: Espainamento Rayleign e Raman (Stokes e Anti-Stokes).	$-\frac{24}{25}$					
Figura 13: Espainamento pela incidencia de luz monocromatica na amostra.	$-\frac{23}{1}$					
Figura 14: Tipos da tecnica de Termogravimetria: a) Termogravimetria isotermica	1, D)					
Firmogravimetria semi-isotermica, c) Termogravimetria dinamica.	$-\frac{27}{20}$					
Figura 15: Representação da Curva DIA.	$-\frac{29}{21}$					
Figura 16: Representação dos arranjos referente aos diferentes momentos magneticos.	$-\frac{31}{24}$					
Figura 17: Fluxograma com as analises de caracterização do cristal.	$-\frac{34}{25}$					
Figura 18: Difratometro da PANalytical modelo Empyrean.	_ 33					
Figura 19: Microscopio Eletronico de Varredura da marca JEOL, modelo JSM-/100F.	_ 36					
Figura 20: Espectrometro FTIR marca Bruker modelo Vertex 70V.	_ 36					
Figura 21: Espectrômetro Raman marca Jobin-Yvon modelo 164000.	$-\frac{37}{20}$					
Figura 22: Analisador térmico (TG/DTA) marca Shimadzu modelo DTG-60.	$-\frac{38}{20}$					
Figura 23: PPMS DynaCool da Quantum Design.	_ 38					
Figura 24: Espectrofotômetro SHIMADZU UV/VIS/NIR/UV-3600.	_ 39					
Figura 25: Cristal ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II).	_ 42					
Figura 26: MEV da amostra do cristal FenSCu, com aumento de 5000x	_ 42					
Figura 27: Espectro de EDS para o cristal ternário FenSCu na região "Spectrum 41" pa	ara a					
amostra cristalina	_ 43					
Figura 28: Morfologia para o cristal ternário FenSCu.	_ 44					
Figura 29: Difratograma de raios X pelo método de Rietveld para o cristal FenSCu.	_ 45					
Figura 30: Célula unitária do cristal de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre	; (II).					
	$-\frac{47}{.}$					
Figura 31: Espectros de FTIR das amostras do cristal FenSCu, 1,10- Fenantrolina Pura e S	erina					
pura.	_ 48					
Figura 32: Espectro Raman para o cristal FenSCu a temperatura ambiente na região espe	ctral					
de //0 a //00 cm -1.	_ 51					
Figura 33: Espectro Raman para o cristal FenSCu a temperatura ambiente na região espe	ctral					
de 700 a 1200 cm -1.	_ 53					

Figura 34: Espectro Raman para o cristal FenSCu a temperatura ambiente na região espectral
de 1200 a 1700 cm -1 54
Figura 35: Curva TG/DTA do cristal ternário FenSCu. 71
Figura 36: Padrão de Difração de Raios X do cristal de 1,10- Fenantrolina e Serina complexado
com Cobre (II) em função da temperatura de 30 a 220 °C, no intervalo de 5-40° (20) 58
Figura 37: Padrão de Difração de Raios X do cristal de 1,10- Fenantrolina e Serina complexado
com Cobre (II) em função da temperatura de 30 a 220 °C, no intervalo de 8-20° (20) 59
Figura 38: Parâmetros de rede a, b e c do cristal ternário FenSCu obtidos pelo refinamento de
Rietveld em função da temperatura (Estrutura Triclínica, P1) 60
Figura 39: Volume da célula unitária do cristal ternário FenSCu obtidos pelo refinamento de
Rietveld em função da temperatura 61
Figura 40: Ângulos α , β e γ do cristal ternário FenSCu obtidos pelo refinamento de Rietveld
em função da temperatura 61
Figura 41: Padrão de difração de raios X em 220 °C da nova fase do cristal ternário FenSCu
pelo método Le Bail 62
Figura 42: Espectro Raman do cristal ternário FenSCu em função da temperatura no intevalo
de 70 a 700 cm - ^{1.} 64
Figura 43: Espectro Raman do cristal ternário FenSCu em função da temperatura no intervalo
de 700 a 1800 cm ⁻¹ 65
Figura 44: Espectro Raman do cristal ternário FenSCu em função da temperatura no intervalo
de 2700 a 3500 cm ⁻¹ 66
Figura 45: Susceptibilidade magnética (xm) em função da temperatura no modo Field Cooled
com ajuste usando a Lei de Curie-Weiss, em campo magnético externo de 10 kOe 68
Figura 46: Susceptibilidade magnética em função de um campo externo aplicado a 2 K 69
Figura 47: Curva analítica para determinação da solubilidade do cristal FenSCu em água _ 71
Figura 48: Perfil de solubilidade do cristal ternário FenSCu.72
Figura 49: Curva dose-resposta para o cristal FenSCu frente linhagem celular HCT-116. 73
Figura 50: Comparação da atividade citotóxica (IC50) de vários antitumorais frente a linhagem
celular HCT -116 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição elementar em porcentagem atômica para o cristal FenSCu nas regiõ	es
analisadas por EDS	44
Tabela 2: Dados cristalográficos para o composto ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina	
complexada com Cobre (II)	46
Tabela 3: Possíveis atribuições das bandas de absorção no FTIR para a amostra do cristal	
ternário FenSCu, comparada com os dados reportados na literatura para 1,10-Fenantrolina e	;
Serina	49
Tabela 4: Modos Raman para o cristal FenSCu no intervalo espectral 70-700 cm ⁻¹ .	52
Tabela 5: Modos Raman para o cristal FenSCu no intervalo espectral 700-1200 cm ⁻¹ .	54
Tabela 6: Modos Raman para o cristal FenSCu no intervalo espectral 1200-1700 cm-1.	55
Tabela 7: Parâmetros magnéticos do cristal ternário de 1,10- Fenantrolina, Serina	
complexado com Cobre (II)	68
Tabela 8: Concentração média das soluções do cristal FenSCu utilizadas para a construção	da
curva analítica (Absorbância = 606 nm).	71
Tabela 9: Concentração do cristal FenSCu em função do tempo.	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
	2.1 Compostos de coordenação na química inorgânica medicinal	
	2.2 Tratamentos para o câncer	
	2.3 Interações dos complexos com o DNA	
	2.4 Atuação dos compostos de cobre na atividade antitumoral	
	2.5 Crescimento de complexos cristalinos em solução aquosa	
	2.6Técnicas de Caracterização	14
	2.6.1 Difração de Raios X (DRX)	15
	2.6.1.2 Método Rietveld	
	2.6.1.3 Método Le Bail	
	2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	
	2.6.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	
	2.6.4 Espectroscopia Raman	
	2.6.5 Análises Térmicas	
	2.6.5.1 Termogravimétrica (TG)	
	2.6.5.2 Análise Térmica Diferencial (DTA)	
	2.6.6 Análises Magnéticas	
3	METODOLOGIA	
	3.1 Síntese do Cristal Ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com	Cobre
(I	II)	
	3.2 Caracterização do Cristal	
	3.2.1 Difração de raios X (DRX)	
	3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	
	3.2.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	
	3.2.4 Espectroscopia Raman	
	3.2.5 Análises Térmicas	
	3.2.6 Análise Magnéticas	
	3.3 Testes Biológico e Químico	
	3.3.1 Avaliação da atividade antitumoral (in vitro)	

	3.3.	2 Ensaio de Solubilidade	39
4		RESULTADOS E DISCUSSÃO (SÍNTESE E CARACTERIZAÇO	ĎES)
••••			41
4	1.1	Síntese do cristal de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre II	41
4	1.2	Difração de Raios X e Refinamento pelo Método de Rietveld	44
4	1.3	Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	47
4	1.4	Espectroscopia Raman em Temperatura Ambiente	50
4	1.5	Analises Térmicas (TG-DTA)	55
4	1.6	Difração de Raios X em Função da Temperatura	57
4	1.7	Espectroscopia Raman em Função da Temperatura	63
4	1.8	Analises Magnéticas	67
4	1.9	Testes Biológico e Químico	70
4	1.9.]	1 Ensaio de Solubilidade	70
4	1.9.2	2 Avaliação da atividade antitumoral (in vitro)	73
5		CONCLUSÕES	76
6		PERSPECTIVAS	78
		REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

Uma área que tem despertado um vasto interesse de pesquisadores da Química Inorgânica é o estudo das funções, metabolismo e aplicações de íons metálicos e seus complexos em sistemas biológicos, em particular no tratamento de doenças. Tem sido mostrado, que complexos de sistemas orgânicos tem grande importância no tratamento do câncer, devido ao aumento da sobrevida de vários pacientes com o uso antitumoral de complexos à base de platina[2, 3].

O câncer é a segunda doença que mais causa óbitos no mundo, com cerca de 110 tipos de diagnósticos diferentes. O câncer de pele, por exemplo, tem várias classificações, uma vez que a pele é composta por mais de um tipo de célula. A doença é caracterizada pelo crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, podendo se espalhar (metástase) para outras regiões do corpo. O crescimento desordenado ocorre devido ao acúmulo de alterações genéticas no DNA que impedem ou dificultam o controle do ciclo celular, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas [4, 5].

A necessidade de descobrir e desenvolver novos fármacos para o tratamento do câncer demanda a exploração de todas as estratégias possíveis. A tradicional estratégia terapêutica para o tratamento desta doença envolve cirurgia para retirada de massa tumoral, radioterapia e/ou quimioterapia [6]

O estudo de compostos orgânicos complexados com íons metálicos, foi muito limitado até a demonstração por Rosenberg e colaboradores no final dos anos 60. Os complexos de metais de transição caracterizados pela sua alta estabilidade, versatilidade estrutural e com propriedades espectroscópicas e redox únicas, têm sido amplamente explorados em estudos de ligação ao DNA, com objetivo de desenvolver novas drogas com propriedades farmacológicas significativas, ou atuar como novos agentes de terapêuticos [7-9].

Na maioria dos complexos estudados, os íons metálicos servem usualmente como um centro redox e os ligantes são responsáveis pelo reconhecimento do DNA. Os modos de reconhecimento são baseados nas interações eletrostáticas, por intercalação, por ligação às cavidades do DNA e/ou ligações de hidrogênio. Compostos polipiridínicos e seus complexos têm atraído amplo interesse biológico devido à capacidade de se ligar ao DNA e RNA, neste contexto, iniciou-se o desenvolvimento de diversos complexos [9-11].

Dessa forma, a 1,10- fenantrolina e seus derivados exibem notável capacidade de coordenação com íons metálicos de transição da primeira e segunda séries de transição. Isto

pode ser justificado pelo efeito quelato e pelo caráter π -receptor desta classe de ligantes, o que favorece a coordenação e consequentemente, uma maior estabilidade na formação destes complexos [12].

Complexos de cobre com compostos aromáticos heterocíclicos têm sido estudados extensivamente devido às suas diversas propriedades físicas e químicas. Em combinação com diferentes ligantes orgânicos, eles têm potenciais aplicações em biomedicina, indústria, proteção do meio ambiente e ciência de materiais[13].

Complexos de cobre (II) com 1,10-fenantrolina e aminoácidos são de particular interesse, por causa de suas várias atividades biológicas, tais como atividade citotóxica, antimicrobianos, antibacterianos, atividade de ligação com o DNA. Verificou-se que os compostos de cobre (II) baseados em aminoácidos mostram eficiente clivagem de DNA, além disso, os complexos metálicos são geralmente mais ativos do que os ligantes isoladamente[13].

O cristal de 1,10-fenantrolina e serina complexado com cobre (II), já foi sintetizado por Esparza e colaboradores [14] em 1995 e teve sua estrutura determinada. Nos anos posteriores, pesquisadores sintetizaram um composto parecido e por meio de sua estrutura avaliaram sua interação em atividades biológicas [13]. Todavia, ainda não existem alguns estudos das propriedades físicas deste material, o que torna algumas de suas características desconhecidas.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho é sintetizar o cristal de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II) pelo método de evaporação lenta do solvente, e estudar as propriedades físico-químicas e biológicas para o uso em antitumorais

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Compostos de coordenação na química inorgânica medicinal

A química inorgânica medicinal tem como características seu caráter multidisciplinar visto que, os elementos químicos desempenham papel crucial em processos biológicos e biomédicos. Além disso, muitos fármacos não possuem mecanismos de ação puramente orgânicos, alguns são ativados por íons metálicos tendo como enfoque maior, os complexos metálicos. Algumas das principais áreas da química inorgânica medicinal podem ser verificados na Figura 1[15].



Figura 1: Áreas de estudo da química inorgânica medicinal

Fonte: Adaptado da referência [15]

Ao longo dos anos a interação metal-ligante com finalidade biológica tem sido bastante estudada. Vem ganhando destaque, o estudo de metalofármacos, complexos com metais de transição com potencial terapêutico aplicados em diversos campos da medicina. Complexos de metais de transição apresentam propriedades estruturais e de reatividade características, incluindo uma ampla faixa de coordenação, geometrias e estados de oxidação, variações de sua termodinâmica e cinética de substituição de ligantes, entre outras [16]. Estes são os responsáveis pela interação específica de complexos metálicos com sítios do organismo, como ácidos nucléicos, carboidratos, lipídeos, membranas, dentre outros.

A química inorgânica medicinal, baseada no uso racional de complexos metálicos para diagnóstico e tratamento de doenças, experimentou um significativo crescimento nos últimos 50 anos. Entretanto, o uso de metais no tratamento de enfermidades já era feito há aproximadamente 5000 anos, de maneira puramente empírica [16-18].

Perante isso, a medicina tem se beneficiado com a introdução de complexos metálicos nos tratamentos de diversas doenças. Uma das utilizações mais importantes e promissoras de complexos metálicos em terapia, é no tratamento do câncer. A pesquisa sobre complexos metálicos com propriedades antitumorais iniciou-se com a descoberta da atividade antitumoral do complexo cis-diaminodicloroplatina(II), comumente conhecido como cisplatina, por Rosenberg e Van Camp no final dos anos sessenta e tem sido estimulada com a descoberta da atividade citotóxica de diversos outros complexos de platina e outros metais, tais como gálio e cobre [2, 8, 19, 20].

Variados complexos metálicos têm sido sintetizados e estudados como agentes para o tratamento de numerosas doenças. Este interesse tem sido a motivação responsável pelo avanço na área da química inorgânica. Todavia, o mecanismo de ação, assim como a principal finalidade biológica destes compostos ainda não foi bem elucidado pela literatura [21].

Inúmeros complexos de Cu (II) com ligantes heterocíclicos divergentes, como ácido glutâmico e fenantrolina, bipiridina, ácido aspártico, e L- ou DL-aminoácidos (serina, glicina, arginina, lisina, etc.) têm sido sintetizado e suas interações com o DNA caracterizadas [22, 23].

Referindo-nos aos aminoácidos, do ponto de vista da coordenação, estes possuem no mínimo dois sítios ativos - o grupo amino (NH₂) e o grupo carboxilato (COO⁻) -para se coordenarem aos metais, sendo considerados assim potenciais agentes complexantes de metais. Além disso, possuem em geral baixa toxicidade e, ao mesmo tempo, elevada afinidade com o organismo humano, podendo ser excelentes carreadores de metais através da membrana de bactérias e também de células tumorais [12].

O agente antineoplásico¹ ideal deveria induzir apoptose² nas células cancerígenas e ser atóxico às células sadias. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Essa é uma das razões que motiva a busca por novos compostos com atividade antitumoral.

¹Medicamento utilizado para destruir neoplasmas ou células malignas ²Morte Celular

2.2 Tratamentos para o câncer

Tumor ou neoplasia é um termo genérico que indica aumento anormal de uma parte ou totalidade de um tecido devido ao crescimento desordenado das células, como pode ser observado na Figura 2. O tumor benigno é aquele no qual as células que se multiplicam se assemelha ao tecido original, já o tumor maligno, também conhecido como câncer é basicamente uma doença de células (crescimento desordenado) caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação celular, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. [6, 24].



Figura 2: Multiplicação das células e surgimento do câncer. Fonte: INCA

Apesar da terapia oncológica ter sofrido um expressivo avanço nas últimas quatro décadas, a incidência e mortalidade populacional ainda são significativas na sociedade global. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018.

Globalmente, uma, em cada seis mortes estão relacionadas à doença, sendo que 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda. Por ser a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, e ter uma etiologia bem complexa, o câncer tem estimulado vários pesquisadores ao redor do mundo, na busca por tratamentos mais efetivos e que causem menos efeitos adversos [25, 26].

Dentre os métodos terapêuticos convencionais de combate ao câncer, a quimioterapia, juntamente com a radioterapia e a cirurgia representam a base terapêutica de atuação no combate ao câncer, tendo como principais metas a cura, o prolongamento da sobrevida e a melhoria da qualidade de vida.

Atualmente, existe um consenso clínico de que a quimioterapia dificilmente atinge os níveis terapêuticos ideais de dose no ambiente tumoral sem que promova danos significativos a órgãos e tecidos sadios. A cirurgia e a radioterapia são apropriadas para tratamento da doença localizada e pode curar nos estágios iniciais do câncer, mas em geral possuem um papel limitado em cânceres mais avançados [27, 28].

O termo quimioterapia refere-se ao tratamento de doenças por substâncias químicas que afetam o funcionamento celular e interferem na capacidade de multiplicação das células cancerosas. Os quimioterápicos são fármacos desenhados para matar ou inibir a proliferação das células cancerígenas. Na prática da clínica moderna, a quimioterapia é prioritariamente utilizada como adjuvante pós-cirúrgico, no intuito de remover metástases microscópicas que possam ter se espalhado a região original do tumor [27, 29].

Dentre os diversos fatores considerados como limitantes à eficiência da quimioterapia, tem-se a heterogeneidade da distribuição dos quimioterápicos na região tumoral como um dos principais fatores limitadores. Uma estratégia capaz de induzir modificações às condições do microambiente tumoral consiste em elevar a temperatura local de forma modesta por um longo período de tempo, processo esse conhecido como hipertermia, que normalmente é administrada em conjunto com outras modalidades terapêuticas, formando uma estratégia terapêutica multimodal [30, 31].

Hipertermia é o procedimento terapêutico empregado para proporcionar aumento de temperatura em uma região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia, com o objetivo de causar a lise das células cancerosas. Seu funcionamento se baseia no fato de que ao submeter a área afetada à temperatura de 41° a 42° C por 30 minutos ou mais cause o efeito de destruir diretamente as células tumorais, uma vez que estas são menos resistentes a aumentos bruscos de temperatura do que as células normais circunvizinhas [32].

A combinação de calor com agentes quimioterápicos pode produzir um efeito cooperativo, que deve depender do agente específico, modificando assim a citotoxicidade de muitos agentes terapêuticos. Os beneficios do calor podem incluir também o aumento da absorção celular de medicamentos. Assim como na quimioterapia, estudos clínicos propõem o uso combinado da hipertermia com a radiação no tratamento do câncer, como estratégia para a

melhora terapêutica, tendo como principal argumentação que as células podem ser seletivamente mortas por esse efeito [33-35].

As Figuras 3 e 4 apresentam dados de resultados de sobrevida para a combinação hipertermia/quimioterapia ou radioterapia quando comparado aos tratamentos sozinhos.



Figura 3: Comparação da sobrevida de 2 anos após tratamento com hipertermia e quimioterapia e quimioterapia sozinha. Os agentes usados foram Cisplatina, Mitomicina, Bleomicina. A hipertermia foi aplicada entre 40 e 60 minutos.

Fonte: Referencia [36]



Figura 4: Resumo dos resultados obtidos pela Sociedade Japonesa de Hipertermia utilizando a hipertermia combinada com a radioterapia.



2.3 Interações dos complexos com o DNA

O câncer é uma doença caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle da proliferação e diferenciação celular, processo esse que é resultado de alterações no DNA. O DNA é o alvo de vários fármacos usados atualmente em terapias medicinais ou em fase de investigação clínica avançadas no combate ao câncer. Somado a isso, o DNA apresenta-se como um alvo ideal para interações com cátions metálicos, uma vez que é rico em ânions fosfatos, átomos de oxigênio e nitrogênio, o que confere a molécula uma afinidade para formar ligações com cátions metálicos [6, 20, 24, 37, 38].

A interação e clivagem de DNA por moléculas sintéticas, foi observada em 1979 com o experimento acidental de Sigman [39]. Este método vem ganhando destaque e abre espaço para a descoberta de novas moléculas capazes de atuar como agentes de clivagem. Esses tipos de sistemas moleculares, em especial complexos metálicos, são importantes, pois possibilitam o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e a busca por terapias antitumorais mais eficientes [40].

Em complexos, os íons metálicos são utilizados como agentes redox e as moléculas que coordenam o metal são responsáveis pela inspeção da molécula de DNA. O interesse para o

desenvolvimento de complexos metálicos com afinidade pela molécula de DNA ocorre devido estes compostos serem capazes de clivar a fita dupla, sendo letal para as células anormais, uma vez que o processo de reparação enzimática não consegue ser refeito [9, 41].

Apesar das interações entre complexos metálicos e o DNA ser amplamente abordado na literatura, a natureza destas ligações, bem como suas geometrias, ainda é um assunto em debate. O fato de o centro metálico ser carregado positivamente faz com que os compostos de coordenação sejam capazes de ligar-se à biomoléculas negativamente carregadas, permitindo que proteínas e ácidos nucléicos sejam alvos desses fármacos, por exemplo [42].

A literatura aborda pelo menos quatro tipos de interação do complexo com a estrutura do DNA, são elas: ligação covalente, através da ligação direta do complexo ao DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato; interação de forma não-covalente por meio de interações eletrostáticas; ligação por sulco e, por último, através da intercalação. Esses tipos de interações podem ser observadas esquematicamente na Figura 5 [43, 44].



Figura 5: Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA. Fonte: Referencia [41]

A interação entre os complexos metálicos e o DNA é norteada por princípios da química geral e de coordenação, onde podemos citar algumas delas, como se segue [42]:

- Os átomos de oxigênio e nitrogênio do DNA presentes nas bases nitrogenadas ou nos grupos fosfato são pontos ideais para a formação de ligações com o centro metálico;
- Complexos que contem íons metálicos menores e pouco polarizáveis tendem a se ligar ao átomo de oxigênio, enquanto os que contêm íons metálicos maiores e muito

polarizáveis se ligam preferencialmente ao nitrogênio, como previsto pela teoria de ácidos e bases duros e moles de Pearson;

 A labilidade dos ligantes presentes no complexo afeta não somente sua capacidade de atingir o alvo farmacológico, como também a tendência na formação da ligação com o DNA.

Nos complexos de cobre com a fenantrolina a interação com o DNA se dá primeiro por intercalação, devido a presença dos 3 anéis aromáticos da 1,10-fenantrolina que são essenciais para esse tipo de interação entre as bases do DNA. Por meio dessa interação, há a formação de espécies de Cu (II) – DNA, que na presença de H_2O_2 ou ácido ascórbico são reduzidas a Cu (I) – DNA gerando radicais hidroxila. Os radicais hidroxila atacam o DNA e, portanto, causam a cisão da fita de DNA [22, 23].

2.4 Atuação dos compostos de cobre na atividade antitumoral

O amplo sucesso da cisplatina no tratamento clínico de vários tipos de neoplasias, colocou a química de coordenação de drogas baseadas em metais na linha de frente para a luta contra o câncer. Embora altamente eficaz no tratamento de uma variedade de cânceres, a cura com cisplatina é ainda limitada por efeitos colaterais. Esses problemas estimularam uma extensa pesquisa e levaram os químicos a desenvolver estratégias alternativas, baseadas em metais diferentes [45].

Os íons metálicos exercem papeis fundamentais no sistema biológico. Eles estão presentes em vários processos bioquímicos, com destaque para o Ferro e Cobre, apresentando também afinidade por biomoléculas como o DNA e proteínas. Desta maneira, não é surpreendente que a natureza tenha atribuído aos metais atividades essenciais nos organismos vivos [46].

O cobre foi um dos primeiros metais utilizados pelas mais antigas civilizações, teve grande importância para produção de espadas, lanças e ferramentas. Atualmente, é um dos metais de maior importância para a indústria moderna, na formação de ligas metálicas, assim como para sistemas biológicos, por se tratar de um elemento biologicamente ativo em organismos vivos [47].

Os compostos de Cobre têm se destacado e tem ganhado espaço na área da química medicinal inorgânica, principalmente quando comparado a drogas antitumorais sintetizadas a partir de metais de transição não encontrados naturalmente no organismo como é o caso da cisplatina. Variados complexos metálicos têm sido sintetizado e estudado como agentes para o

tratamento de numerosas doenças, este interesse tem sido a motivação responsável pelo avanço da química inorgânica, porém, o mecanismo de ação assim como a principal finalidade biológica destes compostos ainda, não foi bem elucidado [48, 49].

Neste campo, os complexos de Cobre mostraram perspectivas encorajadoras. Os complexos baseados em Cobre foram investigados com base na suposição de que os metais endógenos podem ser menos tóxicos para as células normais em relação às células cancerígenas. Além disso, não apresentam somente ligações com a molécula de DNA, mas também exibem boas propriedades antitumorais, devido ao organismo possuir aminoácidos, proteínas e enzimas, que são dependentes deste metal. Com isso, atualmente propõem-se o desenvolvimento de fármacos com metais essenciais ao ser humano, tendo como exemplo, o cobre [9, 45].

O complexo [Cu(phen)₂]²⁺, por exemplo, foi o pioneiro na química de coordenação do Cobre com aplicações biológicas, devido apresentar excelente atividade de interação/clivagem do DNA, e por isso, é considerado um importante modelo biológico no estudo de fármacos anticancerígenos, uma vez que a clivagem pode causar danos ao DNA de células cancerosas, bloqueando assim sua replicação [48].

Todavia, poucos estudos encontram-se dispostos na literatura abordando o processo de formação de cristais ternários complexados com cobre, o que torna algumas características desse sistema desconhecidas até o momento.

2.5 Crescimento de complexos cristalinos em solução aquosa

Um material sólido pode ser classificado de acordo com o arranjo atômico apresentado pelos átomos que o constitui. Essa disposição dos átomos determina se o material terá, ou não, uma estrutura ordenada a longo alcance. Os sólidos cristalinos apresentam um padrão de repetição que se estendem por toda a extensão do material, exibindo sistemas cristalinos bem definidos, ordenados espacialmente entre átomos, moléculas e/ou íons que os constituem [50].

Caso este padrão de repetição estenda-se por toda a extensão de um material, ele é denominado monocristal. Os monocristais podem ser sintetizados em laboratório, mas também encontrados na natureza como, por exemplo, a forma alotrópica do Carbono, o diamante. Alguns monocristais são difíceis de serem produzidos sinteticamente, fazendo necessário conhecer o processo de cristalização, assim como seu ambiente de crescimento [50, 51].

O processo de crescimento de cristais em laboratório pode ocorrer de diversas formas sob a utilização de diversas técnicas, no entanto, o método mais barato e de fácil manipulação para o crescimento de cristais orgânicos e inorgânicos consiste na utilização da água como solvente [52].

O estado de supersaturação é um requisito essencial para o processo de cristalização. Ostwald (1897) introduziu pela primeira vez os termos supersaturação 'lábil' e 'metaestável' para classificar soluções supersaturadas nas quais a nucleação espontânea ocorreria ou não, respectivamente. Se, no entanto, o núcleo crescer além de um determinado tamanho crítico, ele se tornará estável nas condições médias de supersaturação obtidas na maior parte do fluido. O comportamento de uma estrutura cristalina recém-criada em uma solução supersaturada depende de seu tamanho; pode crescer ou redissolver, mas o processo pelo qual passa deve resultar na diminuição da energia livre da partícula. O tamanho crítico, portanto, representa o tamanho mínimo de um núcleo estável [53].

O crescimento de um cristal a partir de uma solução envolve, basicamente, dois processos: (1), tem-se a formação do núcleo cristalino, no qual essa nova fase estável (núcleo) se desenvolve em uma solução instável, denominada de "fase mãe"; (2) consiste no crescimento do núcleo, onde os aglomerados irão crescer de forma ordenada em três dimensões formando uma rede cristalina sólida. O processo de nucleação pode ainda ser dividido em dois processos, a figura 6 apresenta este segmento [54].

O mecanismo pode ocorrer em qualquer ponto do sistema para a nucleação primária, pois não existe nenhum sítio preferencial para o desenvolvimento da fase cristalina. Tal fato caracteriza um processo espontâneo (nucleação homogênea). No entanto, caso haja a presença de agentes nucleadores, como é o caso de impurezas e grãos, haverá sítios favoráveis que irão induzir o aparecimento da fase sólida (nucleação heterogênea). Na nucleação secundária a formação de cristais se torna mais alta em torno de substratos em partes do sistema, sendo este um processo induzido por pequenas sementes de cristais [53-55].

Durante o crescimento dos cristais, os núcleos tendem a se agregar, e, por conseguinte ocorre seu aumento, resultando no desaparecimento em parte ou de toda a fase mãe, na qual se encontrava o soluto dissolvido. A taxa de crescimento irá variar de acordo com as condições em que o cristal seja submetido, uma vez que fatores como a supersaturação, pressão de vapor, temperatura, composição química, solvente, dentre outros fatores que influenciam diretamente no tempo e hábito de crescimento dos cristais [50, 54].



Figura 6: Esquema do processo de nucleação para cristais. Adaptado da Referência [53]

A técnica de crescimento de cristais a partir de uma solução aquosa sob baixa temperatura, é de fácil reprodução e apresenta o menor custo. É a mais utilizada, principalmente em se tratando de matérias que apresentam um baixo ponto de fusão e ebulição. Neste método, é preparada uma solução saturada entre o reagente que se deseja obter e o solvente adequado. A cristalização ocorre com a supersaturação desta solução que pode ser alcançada com a evaporação lenta do solvente [56-58].

A Figura 7 representa uma curva geral de solubilidade com três regiões típicas encontradas para o crescimento de cristais em solução aquosa. A região A é delimitada pela curva de supersaturação, em que existe uma propensão que ocorra mais facilmente a nucleação do cristal. A região B está situada entre a região de supersaturação e instauração, conhecida como zona metaestável. Nessa região o crescimento do cristal só é possível com adição de semente. Já na área C situa-se a região insaturada na qual a solução está em sua forma estável, não existindo pontos para que aconteça a nucleação [53].



Temperatura

Figura 7: Curva de solubilidade de um material hipotético.

Fonte: Adaptado da Referência [53]

Os pontos I, II, III e IV destacados na Figura 7 simulam uma solução aquosa hipotética para o crescimento de cristais em uma temperatura constante, onde o ponto I indica que a solução está na região de instauração, isto é, não favorece a formação dos primeiros núcleos; no ponto II, a solução encontra-se saturada, cujo processo de cristalização não é favorecido devido a estabilidade da solução; na zona metaestável indicada pelo ponto III a solução tende a formar núcleos sobre a semente adicionada; já no ponto IV a solução está altamente instável, pois a concentração do soluto é maior que o ponto de saturação favorecendo a nucleação e consequentemente a formação do cristal.

2.6 Técnicas de Caracterização

Esta seção descreve os conceitos essenciais para a compreensão dos princípios fundamentais para as técnicas instrumentais de caracterização, a fim de facilitar o entendimento de cada técnica que será discutida posteriormente com as propriedades do material.

2.6.1 Difração de Raios X (DRX)

A difração é um fenômeno ondulatório que ocorre quando as ondas passam por um orifício ou contornam um objeto cuja dimensão é da mesma ordem de grandeza que o seu comprimento de onda. Max Von Laue, por volta de 1912 concebeu a possibilidade de realizar a difração de raios X, uma onda eletromagnética cujo comprimento de onda no espectro eletromagnético possui valores entre 1 e 100 Å, utilizando uma estrutura cristalina concebendoa como uma rede de dimensão tridimensional [59, 60].

Os Raios X, foram descobertos em 1895 pelo físico alemão Roentgen e foram assim chamados porque sua natureza era desconhecida [50, 60]. Wilhelm Conrad Roentgen procurando detectar a radiação eletromagnética repetiu o experimento de Joseph John Thompson com um tubo de Crookes e descobre uma nova espécie de radiação produzida pela passagem de uma corrente elétrica pelo tubo sob vácuo, e que possuía a singular qualidade de, embora invisível a olho nu, produzir fluorescência [61, 62].

Estes raios invisíveis que Röntgen designou por "X-strahlen" – "raios-X" lhe valeu, em 1901, o primeiro prêmio Nobel da Física, vieram não só revolucionar a era da Física Atômica no século XX, mas também constituíram um avanço na evolução de outras Ciências, tendo sido a Medicina a mais beneficiada [63]. Os raios X estão localizados entre a radiação γ e os raios ultravioletas, entretanto, os comprimentos de onda, mais comumente usados em cristalografia, variam entre 0,5 e 2,5 °A, uma vez que são da mesma ordem de grandeza que as menores distâncias interatômicas observadas em materiais orgânicos e inorgânicos [59].

Os Raios X são gerados usando dois métodos mais populares ou fontes diferentes. O primeiro é um dispositivo, que é chamado de tubo de raios X, onde ondas eletromagnéticas são geradas a partir de impactos de elétrons de alta energia com um alvo de metal. A segunda é uma fonte muito mais avançada de radiação de raios X - o sincrotron, onde os elétrons de alta energia estão confinados em um anel de armazenamento. Quando eles se movem em uma órbita circular, os elétrons aceleram em direção ao centro do anel, emitindo radiação eletromagnética [59].

A forma mais utilizada para produção de Raios X em laboratório é por meio de tubos de raios X, por serem mais facilmente acomodados em todos os ambientes e, além disso, o custo ser menor quando comparado à luz sincrotron. O tubo de raios X (Figura 8) consiste de dois eletrodos acoplados em uma ampola de vidro selado a vácuo. Os elétrons são emitidos pelo cátodo, normalmente aquecido eletricamente pelo filamento de Tungstênio, e são acelerados em direção ao anodo por um alto potencial eletrostático mantido entre o cátodo e o ânodo [59].



Figura 8: Esquema ilustrativo do funcionamento do tubo de Raios X.

A diferença de potencial gerada entre os dois eletrodos que é criado por um circuito de baixa corrente e alta tensão faz com que os elétrons sejam acelerados até o ânodo. A nuvem de elétrons altamente acelerada retira um elétron da camada mais interna dos átomos que compõe o ânodo gerando vacâncias. Com isso os elétrons da camada mais externa decaem para camada mais interna preenchendo as lacunas gerando a radiação X. Nesse processo, a maior parte da energia cinética dos elétrons que atingem o alvo é convertida em calor (cerca de 99%), menos de 1% sendo transformado em raios X [59, 60].

Foram William Henry Bragg e seu filho William Laurence Bragg, que estudaram o fenômeno observado por Laue, através de um cristal demonstraram a natureza ondulatória dos raios X, o que rendeu aos Braggs um prêmio Nobel de Física no ano de1915 ao deduzirem uma equação chamada de "Lei de Bragg" [64].

Conforme Henry Bragg e Laurence Bragg demonstraram, ao incidir um feixe de raios X sobre um material sólido uma parte desse feixe será dispersa em todas as direções, onde é gerado feixes difratados com reflexão especular entre planos paralelos do cristal que estão

associados à interação do feixe incidente aos elétrons existentes em átomos e/ou íons presentes no material. Os feixes difratados são formados quando as reflexões provenientes dos planos paralelos de átomos produzem interferência construtiva [50, 65].



Figura 9: Representação da difração de raios X por meio de um cristal. Fonte: Referência[50].

Três planos atômicos paralelos são representados na Figura 9 pelas linhas horizontais, onde A-A' e B-B' encontram-se separados por um espaçamento interplanar (d_{hkl}), os quais apresentam índices de Miller (hkl) equivalentes. O feixe de raios X incidente, representado pelas ondas 1 e 2 possui comprimento de onda monocromático igual a λ , que ao incidir sobre os planos é difratado em fase 1' e 2', segundo um ângulo θ . Os raios 1 e 2, são espalhados pelos átomos P e Q, e a diferença entre a trajetória 1P1' e 2Q2'($\overline{SQ} + \overline{QT}$) for igual a um número inteiro(*n*), de comprimento de onda, resultará em uma interferência construtiva e a Lei de Bragg (Equação 3), será satisfeita [50], sendo assim, a condição para a difração é dada por:

$$n\lambda = \overline{SQ} + \overline{QT} \tag{1}$$

Ou

$$n\lambda = d_{hkl}sen\theta + d_{hkl}sen\theta \tag{2}$$

17

$$2d_{hkl}sen\theta = n\lambda \tag{3}$$

A técnica de difração de raios X é utilizada para caracterizar materiais policristalinos pelo método do pó, onde esses materiais são pulverizados em cristalitos pequenos de forma aleatória, fazendo com que todos os planos do cristal sejam favorecidos na análise do difratômetro. [59, 60].

Os difratogramas obtidos por meio das medidas de difração podem ser melhor interpretados quando passam por tratamentos matemáticos, assim como o método *Rietveld* e o método *Le Bail*.

2.6.1.2 Método Rietveld

Com o avanço da informática, com acesso a computadores mais potentes, o método de Rietveld, desenvolvido por Hugo Rietveld, que tem por base a simulação de todo um perfil difratométrico partindo de parâmetros estruturais das fases componentes de uma amostra, permitiu que maiores informações pudessem ser extraídas dos difratogramas[66, 67].

O método de Rietveld utiliza conceitos relacionados ao método dos mínimos quadrados para se obter o melhor ajuste possível entre os difratogramas, realizando os ajustes necessários para aproximar as intensidades dos picos observados experimentalmente com o padrão calculado [68, 69], dado pela Equação 4.

$$Sy = \sum_{i} \frac{1}{yobs} \left(y_{obs} - y_{calc} \right) \tag{4}$$

Onde, y_{obs} = intensidade observada no i-ésimo passo e y_{calc} = intensidade calculada no i-ésimo passo.

Como o intuito do método de Rietveld é minimizar a diferença entre as intensidades observada e calculada, o refinamento tem o objetivo de ajustar os parâmetros de modo a diminuir o valor de Sy. Graficamente, é obtido um bom refinamento quando as intensidades do difratograma calculado sobrepõem às intensidades do difratograma experimental, de tal modo que a linha de diferença entre eles seja o mais próximo de uma reta. O acompanhamento da qualidade do processo de refinamento é dado pelos parâmetros:

$$R - perfil = R_p = \frac{\sum |y_{obs} - y_{calc}|}{\sum y_{obs}}$$
(5)

18

$$R - ponderado = R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum_{y_{obs}}^{1} (y_{obs} - y_{calc})^2}{\sum_{y_{obs}}^{1} (y_{obs})^2}}$$
(6)

$$R - esperado = R_{esp} = \sqrt{\frac{N - P}{\sum_{y_{obs}}^{1} (y_{obs})^2}}$$
(7)

Onde N representa o número de pontos experimentais e P simboliza o número de parâmetros ajustados.

Dentre todos os parâmetros utilizados para o monitoramento da qualidade do refinamento, o R_{wp} é tido o mais significativo, pois o numerador é o residual sendo minimizado, por esse motivo é o melhor indicador do progresso do refinamento [67]. Teoricamente, os valores de R_{wp} devem ser encontrados entre 2 e 10%, considerado um bom refinamento. Entretanto, existem trabalhos que possuem valores entre 10 e 20% que também são resultados razoáveis.

Outro parâmetro muito utilizado para definir a qualidade do refinamento é o GOF (Goodness-of-fit) como demonstrado na equação 8. O valor de GOF deverá ser próximo de 1,0 para refinamentos com boa qualidade no ajuste entre os difratogramas, porém valores abaixo de 4,0 são aceitos [68].

$$Goodness - of - fit = GOF = S = \frac{R_{wp}}{R_{esp}}$$
(8)

2.6.1.3 Método Le Bail

O método de Le Bail concebido por Armel Le Bail em 1988, é utilizado para ajustar padrões de difração quando se conhece os parâmetros de rede (a, b, c, α , β , γ) e o grupo espacial de simetria, mas sem recorrer ao modelo estrutural. A principal aplicação deste método, é a obtenção em conjunto de intensidade integradas que podem ser usadas para a solução de estruturas desconhecidas. Há certa importância neste método devido a uma forte conexão com o método de Rietveld, sendo usado muitas vezes para se obter bons valores dos parâmetros que serão usados posteriormente no Método de Rietveld [70, 71].

O fator de estrutura é extraído a partir das intensidades observadas no padrão de difração através de ciclos de mínimos quadrados, após a eliminação da radiação de fundo. As intensidades foram extraídas do padrão de difração do pó, usando o mesmo método de decomposição que é utilizado no método de Rietveld, onde as intensidades observadas são divididas em diferentes reflexões equivalentes às intensidades calculadas [66, 71].

Há uma diferença do método Le Bail em relação ao método de Rietveld no que diz respeito ao cálculo das intensidades. O método de Rietveld usa as intensidades calculadas baseado no modelo de estrutura cristalina, enquanto o Le Bail faz uso das intensidades observadas no padrão de difração medido. Os valores das intensidades "calculadas" no método LeBail são definidos arbitrariamente. Na decomposição pelo método Le Bail, o número de variáveis livres analisadas por mínimos quadrados torna-se independente do número de reflexões e da radiação de fundo. Dessa forma, a função de perfil de pico e os parâmetros de rede são refinados a cada ciclo [72].

Existe no mercado uma diversidade de softwares, que permitem deconvoluir um padrão de difração de pó e determinar as intensidades individuais, reticulados e fatores de estrutura observados de todas as possíveis reflexões de Bragg. Os programas disponíveis incluem FOX, EXPO, FullProf, GSAS [59].

2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. A forma mais antiga e usual é a lupa seguida do microscópio óptico, que ilumina o objeto com luz visível ou luz ultravioleta. Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, baseado na interação dos elétrons com o material em determinado ponto, onde, sinais são detectados e ampliados concedendo um sinal elétrico que origina uma imagem [73, 74].

A colisão dos elétrons com o material produz um conjunto de sinais diferente, como mostrado na figura 10 que são absorvidos por detectores apropriados e convertidos em sinais elétricos. No caso particular do MEV, o princípio de operação baseia-se fundamentalmente na quantificação dos elétrons secundários emitidos por uma amostra como resposta a uma excitação eletrônica incidente. Esta medida de elétrons secundários (ES) permite uma definição qualitativa da morfologia, e topografia da amostra [75, 76].

Em alguns equipamentos de MEV pode ser acoplado um detector em seus sistemas, denominado de EDS (Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia), o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semi quantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. Dentre as vantagens do EDS, destaca-se o mapa químico, que
quantifica a composição da amostra estudada, por meio da identificação dos elementos que constituem essa amostra [77].

É interessante salientar que durante a interação dos elétrons com a amostra, um efeito indesejado pode ser gerado, chamado de "carregamento", evento este ocasionado em amostras não condutoras, onde há o acúmulo de elétrons na superfície do material que prejudica a formação da imagem. No entanto, este problema pode ser contornado por meio do uso de uma fina camada de um material condutor sobre a amostra não metálica que permitirá o fluxo de elétrons no sistema [74, 78].



Figura 10: Efeitos gerados da interação de um feixe de elétrons com um alvo sólido.

O Microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em Ciência dos Materiais, Biologia, Odontologia, Farmácia, Engenharia, Química, Metalurgia, Física, Medicina e Geologia. É considerado um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos[79].

2.6.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As técnicas de espectroscopia utilizam na atualidade uma ou mais radiações eletromagnéticas, tais como: a radiação ultravioleta, visível, raios X, micro-ondas e

Fonte: Referência [1]

infravermelho, métodos estes que são amplamente empregados nos estudos envolvendo a matéria e suas transformações. Na região do infravermelho (IR), a radiação eletromagnética corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das micro-ondas [80].

Quando um material é exposto à radiação infravermelho, transições vibracionais e rotacionais podem acontecer. Essas transições ocorrem quando a frequência da radiação infravermelha incidente se iguala à frequência de vibração das moléculas que constituem o material. Os principais tipos de vibrações que acontecem no material podem ser observados na Figura 11.

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula. Um espectro infravermelho é comumente obtido pela passagem da radiação infravermelha através de uma amostra e pela determinação de qual fração da radiação incidente é absorvida em uma determinada energia. Para que uma molécula apresente absorção infravermelho deve possuir características específicas: a molécula precisa que o momento dipolar sofra uma variação durante a vibração [81, 82].

A faixa de energia do espectro eletromagnético que corresponde à radiação infravermelha está compreendida em três regiões: o infravermelho próximo, o infravermelho mediano e o infravermelho distante. A faixa de frequência mais utilizada está compreendida no infravermelho médio que vai de 4000 - 400 cm⁻¹. A espectroscopia no infravermelho é bastante utilizada para identificação dos grupos funcionais das amostras que estão presentes nessa faixa de energia do espectro, pois estes grupos possuem bandas características em termos de frequência e intensidade. A banda referente à água por exemplo, apresenta forte absorção em frequências no intervalo entre 3900 – 3200 cm⁻¹ [83, 84].

A determinação /atribuição das bandas de um determinado grupo funcional independe do restante da molécula, uma vez que a vibração característica dessa banda terá sempre a mesma frequência ou valores próximos. Tais vibrações podem variar de acordo com a forma que elas vibram no espaço, podendo ser classificadas em estiramentos e dobramentos [80].

Os estiramentos são movimentos de flexões que os átomos fazem quando estão ligados a um átomo central, resultando em encurtamento ou alongamento do sentido da ligação. Esse tipo de vibração pode ocorrer em fase (simétrico) ou fora de fase (assimétrico) dependendo do comportamento do grupo que está vibrando. Nos dobramentos as posições dos átomos não se alteram, mas as vibrações acontecem formando um eixo perpendicular à direção das ligações o que pode ocasionar deformações para fora ou dentro do plano, assim como alterações nos ângulos entre os átomos (Figura 11) [84].



Figura 11: Movimentos vibracionais dos átomos.

A técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um aprimoramento da técnica de espectroscopia no infravermelho convencional, sendo o método mais utilizado. A elevada sensibilidade e resolução, assim como a rapidez de registro apresentam-se como as grandes vantagens do FT-IR. Este método é baseado na interferência da radiação entre dois feixes resultando um interferograma. Um interferograma, é o registro do sinal produzido pela combinação das múltiplas frequências possíveis de obter com a transformada de Fourier. A conversão do interferograma para espectro em função do número de onda (cm -1) é conseguida por meio de um tratamento matemático [82].

2.6.4 Espectroscopia Raman

Quando há interação da radiação eletromagnética com a matéria, esta radiação pode ser absorvida, transmitida ou espalhada. Dessa forma, essas interações dão origem a uma série de técnicas espectroscópicas, que são úteis na caracterização de materiais, possibilitando obter informações sobre ligações químicas, identificação e quantificação de elementos químicos e moléculas. Espalhando-se a radiação, fótons colidem com as moléculas, essa colisão pode ser elástica ou inelástica. O espalhamento elástico também chamado de espalhamento Rayleight, acontece quando a energia do fóton é a mesma antes e após a colisão. No entanto, quando o fóton cede energia à molécula e sua energia é maior ou menor após a colisão temos o espalhamento inelástico, devido à troca de energia. O espalhamento inelástico é conhecido como espalhamento Raman [85].

O espalhamento inelástico foi demonstrado experimentalmente pela primeira vez em 1928 pelo cientista indiano Sir Chandrasekhara Venkata Raman, após ter sido previsto por Smekal em 1923. A importância da descoberta de Raman foi reconhecida em 1930 quando ele foi agraciado com o prêmio Nobel de Física [86].

Esse tipo de espalhamento da luz (Raman), se dá pela diferença de energia apresentada quando a radiação monocromática interage com a matéria que irá alterar sua polarizabilidade e assim modificar os níveis de energia vibracional e rotacional da amostra. O espalhamento Raman pode ser classificado em Stokes e Anti-Stokes, quando a frequência está abaixo ou acima da frequência incidente, respectivamente. A Figura 12 mostra a diferença de energia quando uma luz monocromática incide sobre a amostra, evidenciando o espalhamento [87-89].

Pode-se utilizar o princípio da lei de conservação de energia (equação 9) para explicar o efeito Raman e seus espalhamentos, onde a frequência da radiação espalhada v_e , é equivalente a frequência de um fóton incidente (v_0) mais ou menos a frequência da molécula (v_m) [80].

$$hv_e = hv_0 \pm hv_m \quad ou \quad v_e = v_0 v_m \tag{9}$$



Figura 12: Espalhamento pela incidência de luz monocromática na amostra

Tentando entender esse efeito, será considerado que um fóton com energia irradia uma molécula em seu estado fundamental E₀, podendo ser excitada devido à absorção dos fótons e transitando momentaneamente para um estado mais energético e instável (Estado Virtual) e em seguida decai para um estado vibracional E₁, pouco acima do fundamental. Como a molécula absorve parte da energia incidente, o fóton espalhado terá menor energia que o fóton incidido, dado por: $v_e = v_0 - v_m$, este processo representa o espalhamento *Stokes* [90].

No caso em que a molécula ao retornar ao seu estado fundamental, o fóton espalhado possui energia igual ao do fóton incidente, esta interação corresponde ao espalhamento Rayleigh, dado por: $v_e = v_0$. Para a situação em que a molécula já se encontra em seu estado vibracional (E₁), quando for irradiada pelos fótons incidente e após a excitação seguida do decaimento para o estado fundamental (E₀), irá gerar fóton espalhado com maior energia do que o fóton incidente, dado por: $v_e = v_0 + v_m$, este representa o espalhamento Anti-Stokes [90].

A Figura 13 exibe os tipos de espalhamentos quando ocorre a incidência de uma luz monocromática, bem como suas definições.



Figura 13: Espalhamento Rayleigh e Raman (Stokes e Anti-stokes)

Apesar de se encontrarem em um estado fundamental, as posições atômicas em uma molécula não são fixas, estão em constante oscilação devido às vibrações e rotações que ocorrem em suas ligações químicas. Por conseguinte, a energia dessas oscilações dos estados vibracional e rotacional de uma molécula terá influência na energia do fóton espalhado juntamente com a radiação incidente [87, 90].

As aplicações da técnica por espectroscopia Raman são vastas por oferecerem informações importantes quanto à constituição química e estrutura dos materiais analisados, além de possibilitar que as análises sejam realizadas em diferentes estados físicos, como soluções, cristais, pó, etc. Além do mais, como a amostra é preparada não exige um alto grau de complexidade e se trata de uma técnica não destrutiva [91, 92].

2.6.5 Análises Térmicas

As análises térmicas são técnicas fundamentais para o entendimento de todo o comportamento físico ou químico quando um material é submetido a uma variação de temperatura, onde é possível medir as mudanças em suas propriedades. Nessa seção serão apresentados os fundamentos referentes às técnicas utilizadas para as análises térmicas utilizadas neste trabalho.

2.6.5.1. Termogravimetria (TG)

A Termogravimetria é uma técnica que se baseia no estudo da variação mássica que a amostra apresenta em função da temperatura ou do tempo, podendo estar relacionada a eventos químicos e/ou físicos dependendo da característica do material a ser analisado [93].

Essa técnica pode ser conduzida de três maneiras distintas: termogravimetria isotérmica (a massa da amostra é registrada em função do tempo com temperatura constante), semiisotérmica (a amostra é aquecida à massa constante a cada série de acréscimo de temperatura) e dinâmica (a amostra é aquecida com variação de temperatura pré-determinada), conforme mostra a Figura 14 [94].



Figura 14: Tipos da técnica de Termogravimetria: a) Termogravimetria isotérmica, b) Termogravimetria semi-isótermica, c) Termogravimetria dinâmica.

Como em qualquer técnica experimental, existem na termogravimetria alguns fatores que afetam a natureza e precisão nos resultados experimentais. Dessa forma, Mothé e Azevedo [94]apontam alguns fatores que podem influenciar a curva de variação de massa da amostra, classificando em duas categorias: os fatores relacionados ao equipamento (instrumentais) e às características da amostra.

Dentre os fatores instrumentais que afetam as análises térmicas, pode-se destacar: i) Atmosfera do forno, visto que é necessário controlar a natureza e o fluxo de gás que será ambientada a amostra; ii) Razão de aquecimento; iii) geometria do forno; iv) composição da amostra, dentre outros. Portanto, conhecer o material no qual está se trabalhando é fundamental para a escolha desses parâmetros, além de reconhecer os objetivos que serão alcançados [94].

Referindo-se aos fatores ligados às características da amostra estão: i) Calor de reação, que envolve processos termodinâmicos intrínsecos ao material; ii) condutividade térmica; iii) empacotamento da amostra; iv) natureza da amostra; quantidade de amostra, (pois em pequenas quantidades observa-se maiores números de efeitos, além de verificar intermediários formados) [94].

A análise termogravimétrica proporciona diversas aplicações, seja no estudo de estabilidade térmica de materiais até pesquisas relacionadas ao tempo e velocidade para a evaporação de líquidos e/ou componentes voláteis. Dentre essas aplicações destaca-se a

corrosão de materiais em várias atmosferas, decomposição de materiais explosivos, decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos, no controle da qualidade de medicamentos, estudo da cinética das reações envolvendo espécies voláteis, etc. [94, 95].

2.6.5.2 Análise Térmica Diferencial (DTA)

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica térmica de medição contínua das temperaturas da amostra e de um material de referência (termicamente inerte), à medida que ambos vão sendo aquecidos ou resfriados em um forno. Nas curvas de DTA podem aparecer eventos endotérmicos e exotérmicos, e dependendo da configuração do equipamento, esses eventos podem surgir como picos para cima indicando um evento exotérmico e picos para baixo referente a eventos endotérmicos e vice-versa [96].

Mudanças de temperatura da amostra são ocasionadas pelas transições ou reações entálpicas, decorrentes de alguma alteração do material, seja mudança de fase, fusão, inversões de estruturas cristalinas, sublimação, oxidação, reações de desidratação, dentre outros. Alguns eventos são característicos de eventos endotérmicos ou exotérmico, onde geralmente transições de fase e desidratação produz efeito endotérmico, enquanto cristalização e oxidação produzem efeitos exotérmicos [94]. Na Figura 15 é possível observar alguns eventos relacionados à curva de DTA.

As mudanças de temperatura ocorridas durante estas variações físicas ou químicas são detectadas pelo método diferencial, no qual as temperaturas da referência e da amostra são mencionadas como T_r e T_a, respectivamente, e a função armazenada é a diferença T_a – T_r= Δ T, em função da temperatura ou do tempo, visto que tanto o aquecimento como o resfriamento são processos realizados de forma linear (dT/dt = Cte) [94, 96].



Tempo

Figura 15: Representação da Curva DTA.

Fonte: Adaptado da referência [97]

Tendo o intuito de se obter uma maior resolução e precisão em determinadas temperaturas em que ocorrem alterações na massa, atualmente, devido às dificuldades encontradas por meio de uma simples visualização na interpretação das curvas de TG, o mercado dispõe de equipamentos que realizam medidas de TG-DTA simultaneamente, para sanar esse tipo de dúvida gerada pelos analistas, sendo assim uma grande vantagem possuir ambas as técnicas em um único equipamento [98].

2.6.6 Análises Magnéticas

O magnetismo, fenômeno pelo qual os materiais impõem uma força de atração ou repulsão sobre outros materiais é conhecido há milhares de anos, fenômeno este que pode ser explicado pelo movimento das partículas carregadas eletricamente, ou seja, é o estudo do spin eletrônico e nuclear e suas interações [50, 99].

Conforme com o princípio de exclusão de Pauli, somente dois elétrons podem preencher um determinado nível de energia. Esses elétrons têm direções de spin opostas (s= $+\frac{1}{2}$, s= $-\frac{1}{2}$), e seus momentos magnéticos se cancelam. Existem dois tipos de movimentos de elétrons: orbital e spin. Cada um tem um momento magnético associado a ele [100, 101].

Nos sistemas atômicos, o momento angular (L) está associado ao movimento orbital dos elétrons em torno do núcleo e o momento angular intrínseco (S), o spin, que resulta num

momento de dipolo magnético. Desta forma, o momento magnético de um átomo corresponde à soma dos momentos magnéticos (L + S) de cada um dos seus elétrons [102-104].

O comportamento apresentado pelos materiais magnéticos na presença de um campo externo pode ser determinado pela origem dos dipolos e pela interação entre eles. Quando um material é submetido a um campo magnético (H), todos os momentos magnéticos individuais desse material contribuem para sua resposta a este campo magnético. Para essa resposta é dado o nome de indução magnética (B) e pode ser relacionada com a equação a seguir:

$$B = \mu_0 H \tag{10}$$

onde μ_0 é uma constante denominada permeabilidade do vácuo, ou seja, o meio específico no qual o campo H passa e onde B é medido [99, 103].

Quando se trata de obter a indução magnética em materiais, é necessário considerar a contribuição da magnetização (M) desses materiais. Assim, a indução magnética é obtida da seguinte forma:

$$B = \mu_0 (H + M).$$
(11)

O estado magnético de um material pode ser descrito de acordo com a presença de um campo magnético, como:

$$M = \chi H \tag{12}$$

Em que χ é a susceptibilidade magnética. A mesma é uma resposta quantitativa de um material a um campo magnético aplicado e é utilizado para classificar o comportamento magnético segundo a resposta do material ao comportamento magnético aplicado.

Considerando a resposta a um determinado campo aplicado, o comportamento desses materiais é comumente classificado em uma das seguintes categorias: diamagnético, paramagnético, ferromagnético e antiferromagnético [101]. A Figura 16 ilustra de forma representativa a organização dos momentos magnéticos para estes tipos de comportamento magnético.



Figura 16: Representação dos arranjos referente aos diferentes momentos magnéticos. Fonte: Própria autora

Observando os materiais paramagnéticos, nota-se que os momentos magnéticos estão alinhados aleatoriamente, resultando em magnetização nula. Nos ferromagnéticos, os momentos magnéticos adjacentes se alinham paralelamente, enquanto que nos antiferromagnéticos este alinhamento é antiparalelo.

O comportamento diamagnético consiste na mais fraca resposta magnética, sendo este induzido pelo campo magnético externo, isto se deve ao fato dos subníveis eletrônicos estarem completos fazendo com que os elétrons fiquem emparelhados e se cancelem, podendo ser encontrado em todos os materiais. Já materiais que apresentam o comportamento paramagnético são aqueles em que o momento dipolo magnético é não nulo, sendo este processo proveniente de elétrons desemparelhados de uma amostra [99, 105].

As propriedades diamagnéticas e paramagnéticas são intrínsecas de átomos individuais, já as características do ordenamento ferromagnético e antimagnético, dependem das interações de spins eletrônicos de muitos átomos vizinhos, ou seja, esta interação é produto de um efeito sinérgico [99, 106].

Materiais ferromagnéticos são caracterizados pelo alinhamento paralelo dos momentos atômicos existentes onde ocorre uma magnetização espontânea. Este alinhamento pode sofrer uma degeneração pelo efeito da energia térmica gerada pelo decréscimo da magnetização em função da temperatura. Esta temperatura na qual a magnetização espontânea é reduzida a zero é conhecida como temperatura de Curie, e a partir daí o comportamento desses materiais tornase paramagnético [101].

A lei de Curie descreve as características de materiais puramente paramagnéticos em toda faixa de temperatura devido aos íons com elétrons desemparelhados, no qual a susceptibilidade magnética (χ) varia de acordo com a constante de Curie (C), e inversamente com a temperatura (T). A equação 13 representa esta sentença [106].

$$\chi = \frac{c}{\tau} \tag{13}$$

Materiais com propriedades magnéticas têm sido intensamente pesquisado e estudado na área da saúde/medicina devido ao seu grande campo de aplicação, como portadores magnéticos no direcionamento de drogas, hipertermia no tratamento de tumores, imagens de ressonância magnética, bioseparação magnética, controle na administração de fármacos em pacientes, dentre outros [107].

3. METODOLOGIA

Nesta seção será apresentada a metodologia empregada para a síntese do cristal ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cu (II), assim como será mostrado os equipamentos utilizados para a caracterização do material, juntamente com os parâmetros definidos para cada método de análise. Ressaltando que todo o processo de preparo, síntese e caracterização do material foram realizados na Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais (UPCM) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – Campus Imperatriz. Foram realizadas medidas de colaboração científica na Universidade Federal do Pará (UFPA) e no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Os testes biológicos foram realizados em parceria com o curso de Medicina da UFMA – Campus Imperatriz.

3.1 Síntese do Cristal Ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II).Para síntese e crescimento do cristal, utilizou-se materiais e equipamentos do Laboratório de Difração de Raios X (LDRX) e o Laboratório de Crescimento de Cristais (LCC) da UPCM.

O material foi sintetizado utilizando os compostos 1,10-fenantrolina e nitrato de cobre (II), ambos com pureza de 98 % assim como, os compostos Serina e Bicarbonato de Sódio com pureza de 99%, todos eles fornecidos pela empresa *Sigma-Aldrich*. O cristal foi sintetizado por meio da preparação de solução equimolar, utilizando a técnica de evaporação lenta do solvente.

Primeiramente foi preparada uma solução de 1,10- fenantrolina, utilizando uma massa de 0,099g (0,05 mmol) em um volume de 10 ml, sendo 7ml de metanol e 3ml de água deionizada em um Becker. Após homogeneizada foi adicionado à solução o nitrato de cobre II (0,125g /0,05 mmol) ficando em agitação magnética em uma temperatura de 70 °C. Adiante, foram adicionados um por vez o aminoácido (serina) (0,053g/ 0,05 mmol) e o Bicarbonato de Sódio (0,042g/ 0,05 mmol) à mistura do metal com a 1,10- fenantrolina.

A nova solução formada ficou em agitação por um período de 3 horas. Ao final, a solução formada foi deixada em um becker vedado com filme de Policloreto de Vinila (PVC) com pequenos furos e este mantido em uma estufa com temperatura constante de 35 °C. O cristal obtido nesse estudo foi nomeado de cristal ternário FenSCu.

3.2 Caracterização do Cristal

As caracterizações realizadas para o estudo do cristal ternário FenSCu, encontram-se esquematizadas na Figura 17, e são detalhadas posteriormente.



Figura 17: Fluxograma com as análises de caracterização do cristal.

T – Temperatura; H – Campo Magnético; DRX – Difração de Raios X; FTIR – Infravermelho por Transformada de Fourier; MAG – Magnetização; MEV-EDS – Microscopia Eletrônica de Varredura-Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia; TG/DTA – Termogravimetria-Análise Térmica Diferencial.



3.2.1 Difração de raios X (DRX)

Para confirmar a complexação do metal com aminoácido e 1,10- fenantrolina e sua fase utilizado nesse estudo, foram medidas pela técnica de difração de raios X, onde pulverizou-se o cristal em almofariz de ágata com pistilo e colocou-se em um porta amostra de vidro.

Posteriormente o material foi levado a um Difratômetro da *PANalytical* modelo *Empyrean* (Figura 18), operando com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418$ Å), geometria Bragg-Bretano, monocromador de grafite pirolítico no feixe difratado, com câmara de temperatura *Anton-Paar* modelo *TTK 450*. Para o estudo de difração de raios X à temperatura ambiente e em função da temperatura.

Nesta medida, foi utilizado passo angular de 0,02°, em intervalo angular de 5-40°, e tempo de aquisição de 2 s, em uma faixa de temperatura variando de 303 a 493 K. A medida foi realizada no Laboratório de Difração de Raios X (LDRX) da UPCM, campus Imperatriz.

Os resultados que foram obtidos por meio da técnica de difração de raios X do cristal, empregou-se o método *Rietveld* (método utilizado na caracterização de materiais cristalinos na forma de pó), o qual faz uso de parâmetros de rede cristalina que estão estabelecidos na literatura, que são refinados para exibir os dados coletados no difratograma das amostras sintetizadas. Foi utilizado o *software* GSAS-EXPGUI para realização do refinamento da estrutura cristalina do material.



Figura 18: Difratômetro da PANalytical modelo Empyrean.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias do MEV foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo térmico da marca JEOL, modelo JSM-7100F (Figura 19), com magnificação de 5000x, operando em aceleração de voltagem de 15kV com filamento de tungstênio em uma câmara a vácuo. O pó do cristal ternário FenSCu foi adicionado em *stubs* de alumínio e analisado. As análises de EDS foram coletadas por meio de um detector de quantificação elementar pertinente ao MEV. A medida por meio do MEV-EDS foi realizada no CBPF no laboratório de microscopia



Figura 19: Microscópio Eletrônico de Varredura da marca JEOL, modelo JSM-7100F.

3.2.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a determinação e classificação de bandas vibracionais dos grupos funcionais presentes no material em estudo, foi utilizado um *FTIR Vertex* 70v, da *Bruker* (Figura 20), detector InGaAs e DLaTGS, em uma média de 32 varreduras, com resolução espectral de 4cm⁻¹. A medida foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica II (LEOF II) na UPCM.

Foi empregada a técnica de pastilhas de KBr para as análises em que se preparou pastilhas com composição percentual de 99% de KBr e 1% de amostra, na qual foram prensadas a 8 toneladas durante um tempo médio de 30 segundos, cabe ressaltar que para fins comparativos, foram realizadas medidas para avaliar o surgimento e o desaparecimento de bandas no cristal ternário FenCuS em comparação com os compostos de partida 1,10-Fenantrolina e Serina.



Figura 20: Espectrômetro FTIR marca Bruker modelo Vertex 70V.

3.2.4 Espectroscopia Raman

A fim de verificar possíveis alterações nas propriedades vibracionais do cristal semi orgânico sintetizado foi realizada medida *Raman* em um espectrômetro triplo, marca *Jobin-Yvon* modelo *T64000* (Figura 21) com detector CCD resfriado a ar. Utilizando laser de estado sólido, com $\lambda = 514,5$ nm, potência de 10 mW, resolução espectral de 2 cm⁻¹ e com 8 acumulações. A medida foi realizada na Universidade Federal do Pará.

Os espectros de Raman em função da temperatura foram obtidos em um forno resistivo acoplado ao espectrômetro. Utilizando um laser de estado solido, com $\lambda = 532$ nm, potência de 100 mW com 5 acumulações, em um intervalo de 294 a 433 K.



Figura 21: Espectrômetro Raman marca Jobin-Yvon modelo T64000.

3.2.5 Análises Térmicas

Foi realizado o estudo das propriedades térmicas do cristal ternário FenSCu, sendo caracterizada por TG-DTA simultâneos.

As análises TG-DTA foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas (LAT) na UPCM. Na medida, a amostra foi analisada de forma simultânea por meio de um analisador termogravimétrico da *Shimadzu* modelo DTG-60 (Figura 22) utilizando cadinho de alumínio fechado, numa atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 ml/min, com uma faixa de temperatura de 298 a 1173 K em razão de aquecimento de (10°C) /min.



Figura 22: Analisador térmico (TG/DTA) marca Shimadzu modelo DTG-60.

3.2.6 Análise Magnéticas

As medidas de magnetização em função da temperatura e do campo foram realizadas em um PPMS (*Physical Property Measurament System*) da Quantum Design, modelo DynaCool. A Figura 23 ilustra o equipamento utilizado.



Figura 23: PPMS DynaCool da Quantum Design.

Quanto a medida com temperatura foi escolhida o intervalo de 2 a 300 K, e campo externo constante de 10 kOe. Já para a análise da magnetização em função da aplicação de um campo externo, foi utilizado um campo na faixa entre -90000 a 9000 kOe, em uma temperatura fixa de 2 K. Estas caracterizações foram realizadas em um cristal com massa de 1,8 mg.

Vale destacar também, que as medidas de magnetização foram realizadas no CBPF no laboratório de magnetometria.

3.3 Testes Biológico e Químico

3.3.1 Avaliação da atividade antitumoral (in vitro)

Foram plaqueadas células da linhagem HCT-116 por poço, em placas de 96 poços $(5x10^4 \text{ células/ml em 200 ml de meio})$. Após um período de 24 horas, o cristal FenSCu foi adicionado em concentração seriada (1:1) de 116,8 µM a 7,47x10⁻³ µM, cada concentração em duplicata e incubada por 72 horas. Depois de passadas as 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) 0,5 mg/ml. Passado 3 horas o sobrenadante foi removido e o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância foi medida a 570 nm. Posteriormente foram calculadas as IC₅₀ (concentração do composto necessária para inibir o crescimento em 50% da totalidade das células), obtidas pela curva dose-resposta, a partir da equação de modelo sigmoidal.

3.3.2 Ensaio de Solubilidade

Para o estudo de solubilidade do cristal FenSCu, preparou-se uma solução supersaturada do cristal em 100 ml de água deionizada, com pH=7. Esta solução foi colocada sob agitação magnética a 360 RPM, a 35 °C durante 240 minutos, onde foram retiradas alíquotas em intervalos de tempos pré-determinados. O material foi determinado pela absorbância em um comprimento de onda de 606 nm, usando um espectrofotômetro UV/VIS/NIR/UV da marca Thermo Scientific modelo Evolution 220 (Figura 24), no intervalo de comprimento de onda de 500 a 1100 nm, utilizando cubetas de quartzo. A medida foi realizada no Laboratório de Síntese e Caracterização de Materiais Farmacêuticos (LABFARMA) na UPCM.



Figura 24: Espectrofotômetro SHIMADZU UV/VIS/NIR/UV-3600.

Além disso, construiu-se uma curva analítica padrão baseada, na associação entre as concentrações conhecidas do cristal FenSCu e suas respectivas absorbâncias em 606 nm. A metodologia utilizada foi feita paralelo a métodos já dispostos na farmacopeia britânica [108].

4.1 Síntese do cristal de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre II

O cristal ternário FenSCu, fora obtido por meio da técnica de evaporação lenta do solvente, após um período de 7 dias, em pH 8,6. O cristal formado exibe coloração azul escuro, sugerindo a possível complexação da 1,10- Fenantrolina (Phen) e Serina (Ser) aos íons de Cu^{2+,} possuindo a seguinte formula [Cu (C₃H₆NO₃) (C₁₂H₈N₂) (H₂O)]NO₃.

O Cobre é um elemento da primeira série de transição, de número atômico 29, que ocorre nos estados de oxidação +1, +2 e +3. Os estados de oxidação mais importantes no meio biológico são os +1 e +2. O estado de oxidação +1 apresenta configuração [Ar]3d¹⁰, tendo os orbitais eg e t2g completos. Portanto, a grande maioria dos complexos de cobre (I) é diamagnética e a ausência de transições d-d implica em compostos incolores. No estado de oxidação +2 a configuração [Ar]3d⁹ apresenta os orbitais t2g completos, enquanto os orbitais eg estão semipreenchidos, o que faz que seus compostos sejam paramagnéticos e coloridos [109].

O estado de oxidação +2 para o metal é o mais estável e importante, seus complexos geralmente exibem distorções, como é o caso do cristal FenSCu deste estudo, que apresenta uma estrutura de pirâmide quadrática levemente distorcida [14].

Já para o complexo formado, a coloração azul intensa pode ser explicada devido aos ligantes que se coordenam ao metal, bem como a presença de elétrons d nos orbitais do centro metálico [110].

O cobre coordenado a um ligante de campo fraco absorve em um comprimento maior de onda (716 nm), por isso é observado uma coloração azul fraca. Diferentemente do que ocorre quando o cobre se coordena a ligante de campos fortes, onde o comprimento de onda absorvido é menor (620 nm), implicando na cor azul intensa [111]. O cristal apresentou dimensão média de 1,10 x 4,42 x 5,38 mm³, como pode ser observado na Figura 25, que mostra o cristal crescido pela técnica de evaporação lenta do solvente.



Figura 25: Cristal ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II).

Para se verificar com mais detalhes a superfície do cristal formado, assim como comprovar a presença de alguns elementos químicos que constituem a amostra foi obtido uma imagem (fotomicrografia) com resolução tridimensional utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 26 apresenta a microestrutura do cristal FenSCu.



Figura 26: MEV da amostra do cristal FenSCu, com aumento de 5000x

A partir da imagem (Figura 26) obtida pelo MEV para o cristal FenSCu, pode se verificar imperfeições na superfície do cristal, uma vez que é observado na fotomicrografia a presença de grãos de tamanhos aleatórios na microestrutura do material.

Foi possível também, analisar de forma simultânea por meio do MEV a composição química do material sólido com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico. A Figura 27 mostra o espectro de EDS obtido para o cristal analisado na região denominada "spectrum 41" apontado na Figura 26 da amostra cristalina.



Figura 27: Espectro de EDS para o cristal ternário FenSCu na região "Spectrum 41" para a amostra cristalina.

As análises de EDS mostraram que os elementos se distribuem na amostra cristalina de forma irregular, uma vez que em áreas da superfície do cristal há predomínio de alguns elementos, assim como a ausência de outros elementos, que pode ser visto na Tabela 1.

Percebe-se que na região denominada " Spectrum 41" o carbono é elemento que possui a maior porcentagem (53,4%) que é proveniente dos 15 átomos de C originário das moléculas orgânicas que formam o cristal [14]. A concentração de Cobre presente na amostra cristalina está variando de acordo com a região analisada. Na área "Spectrum 41" como pode ser visto na Figura 26, tem-se 2,8% de porcentagem atômica referente ao íon Cu²⁺, as demais regiões e suas respectivas concentrações para o íon assim como para os demais elementos presentes no cristal podem ser vistas na Tabela 1.

Porcentagem Atômica (%)						
Spectrum	С	0	Ν	Cu		
41	53,4	24,8	19	2,8		
42	83,6	13,6		2,7		
43	83,2	13		3,8		
44	79,7	17,4		2,9		

Tabela 1: Composição elementar em porcentagem atômica para o cristal FenSCu nas regiões analisadaspor EDS.

Baseado no formato e na sua morfologia, a Figura 28 mostra que o monocristal crescido possui catorze planos morfológicos predominantes, sendo eles: (-100), (-101), (-110), (-111), (01-1), (010), (100), (10-1), (1-10), (1-1-1), (0-10), (0-11), (00-1), (001).



Figura 28: Morfologia para o cristal ternário FenSCu. Dados extraídos do cristal teórico FenSCu obtido pelos *softwares* Conquest 1.19 e Mercury 3.9.

4.2 Difração de Raios X e Refinamento pelo Método de Rietveld

A estrutura do cristal foi confirmada por intermédio de medidas de difração de Raios X (DRX), no qual foi aplicado o método de Rietveld para o padrão de difração do cristal. A Figura 29 mostra o padrão de difração refinado pelo método de Rietveld, onde se comparou o difratograma experimental (pontos), com o teórico (linha vermelha), e a diferença (I_{Exp} – I_{Calc})

que existe entre as duas intensidades. Foi possível observar que o refinamento mostra para o cristal FenSCu, fator R_{wp} = 8,02% e R_p = 5,32% abaixo de 10% confirmando assim que o refinamento apresenta padrões de confiabilidade.

O cristal FenSCu cristaliza-se em estrutura triclínica, com grupo espacial P1 contendo duas moléculas por célula unitária (Z=2). Os parâmetros de rede obtidos pelo refinamento *Rietveld* mostram para o cristal: a = 7,635(3) Å, b = 10,052(4) Å, c = 12,019(7) Å, $\alpha = 97,43(3)$ °, $\beta = 106,84(3)$ °, $\gamma = 108,75(3)$ ° Å e V = 920,9 (7) Å³.

Os dados obtidos neste estudo se assemelham com os valores encontrados por ESPARZA et al.,1995 que realizou algumas caracterizações no cristal[14], cuja diferença percentual é inferior a 1 %. A Tabela 2 mostra uma comparação dos dados do refinamento de Rietveld com os dados dispostos na literatura.



Figura 29: Difratograma de raios X pelo método de Rietveld para o cristal FenSCu.

	FenSCu					
Dados Cristalográficos	Valores da Literatur	a Valores desse Estud	o Diferença			
Datus Cristalograncos	[13]		Percentual (%)			
Sistema Cristalino	Triclínico (P1)	Triclínico (P1)				
	<i>a</i> = 7,624 (2) Å	<i>a</i> = 7,635 (3) Å	0,14 %			
Parâmetros de Rede	<i>b</i> = 10,027 (2) Å	<i>b</i> = 10,052 (4) Å	0,25%			
	<i>c</i> = 12,001 (3) Å	<i>c</i> = 12,019 (7) Å	0,15%			
	$\alpha = 97,46(1)^{\circ}$	$\alpha = 97,43(3)^{\circ}$	0,03%			
Ângulo	$\beta = 106,79 (1)^{\circ}$	$\beta = 106,84 (3)^{\circ}$	0,04%			
	γ = 108,76 (1) °	$\gamma = 108,75$ (3) °	0,009%			
Volume	916,2 (3) Å ³	920,9 (6) Å ³	0,51%			
Número de moléculas	7 - 2	7 - 2				
por célula unitária	$\Sigma = Z$	L = 2				

 Tabela 2: Dados cristalográficos para o composto ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexada com Cobre (II) com comparação entre dados experimentais e da literatura .

Baseados nos dados obtidos e apresentados a Figura 30 é referente à célula unitária do cristal FenSCu na fase triclínica, em temperatura ambiente, observada por meio do eixo *b*, a célula unitária é formada por dois átomos de cobre, duas moléculas de água, duas moléculas de 1,10-Fenantrolina, duas moléculas de Serina e duas moléculas de nitrato que se repetem por toda a estrutura cristalina, vale ressaltar que o nitrato não está coordenado ao metal.

Cada íon Cu²⁺ é cercado por cinco átomos de ligantes (pentacoordenado), em uma configuração do tipo pirâmide quadrada levemente distorcida, a base é definida, com distorção tetraédrica insignificante, pelo átomo de N alifático e um dos átomos de O do aminoácido e os dois átomos de N do ligante de fenantrolina[14].



Figura 30: Célula unitária do cristal de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II).

Baseado na célula unitária (Figura 30) nota-se que o íon metálico Cu^{2+} está ligado a dois átomos de nitrogênio (N₁;N₂) provenientes da molécula de 1,10-Fenantrolina, a um átomo de nitrogênio (N₃) e um átomo de oxigênio (O₂) oriundos do aminoácido Serina, estes se encontram dispostos no plano equatorial para a estrutura. Na posição axial tem-se ainda um átomo de oxigênio (O₁) proveniente da molécula de água. A estrutura do cristal é determinada por ligações de hidrogênio fracas e também por interações π - π entre unidades de fenantrolina.

4.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada com a intenção de confirmar e comparar os grupos funcionais presentes na composição do cristal sintetizado. Para uma melhor atribuição e concordância das bandas foram analisados os espectros dos compostos de partida: 1,10 – Fenantrolina e Serina, a fim de conferir as possíveis alterações no espectro por meio de uma análise comparativa. A Figura 31 apresenta os espectros obtidos, na qual estão apontadas algumas vibrações características dos compostos de partida como do cristal complexado.



Figura 31: Espectros de FTIR das amostras do cristal FenSCu, 1,10- Fenantrolina Pura e Serina pura.

As bandas que surgem com fraca vibração em números de baixo número de onda, são devido à interação do íon metálico com o ligante. Isso pode ser observado na banda reconhecida em número de onda 432 cm⁻¹atribuída ao estiramento (vCuO) (metal-aminoácido) e em 555 cm⁻¹atribuída ao estiramento (v CuN) (metal – fenantrolina), como foi observado por Sharma [112].

Na literatura, é reportado, que os espectros de FTIR característicos da 1,10- Fenantrolina estão compreendidos no intervalo de 600 a 1750 cm⁻¹, que podem ser observados na Tabela 3 para os números de onda 723 cm⁻¹, 784 cm⁻¹ e 856 cm⁻¹ que são típicos da deformação angular fora do plano referentes à vibração CH, γ (C-H) da molécula de 1,10- Fenantrolina.

As vibrações análogas à deformação angular no plano, observadas em 1105 cm⁻¹ e 1147 cm⁻¹ para o complexo ternário são originarias da molécula de 1,10- fenantrolina, relacionado a ligação CH, δ (C-H). Essas classificações foram descritas por Awad [113] em seus estudos com complexos metais de transição com 1,10- Fenantrolina.

Os modos vibracionais em 1496 cm⁻¹, 1519 cm⁻¹ e 1584 cm⁻¹ são referentes ao estiramento C-C aromático, (C-C) [114, 115]. Já o estiramento percebido em 1631 cm⁻¹ caracteriza o modo para CO, v(C=O) proveniente da molécula de Serina, como analisado por Vusak [13] em seu estudo com complexo de cobre (II) com Serina e Fenantrolina.

As bandas apresentadas com números de onda 3213 e 3284 cm⁻¹ são referentes ao estiramento NH, ν (N-H) do grupo amina proveniente do aminoácido. Diante disto, e em conformidade com MarkovićJudaš e Sabolović, após a coordenação de um aminoácido ao íon Cu²⁺, são geradas vibrações (N-H) em torno de 3000 a 3500 cm⁻¹, referentes ao grupo amina na sua forma desprotonada, que contribui para uma maior estabilização da molécula ao complexo [116].

DADOS EXPERIMENTAIS								
Complexo Ternário 1,10-Fenantrolina					Serina			
N° de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Ref.	N° de onda (cm ⁻¹)	Atribuiçã o	Ref.	N° de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Ref.
432	v(Cu-O)*	[112]	710	γ(C-H)	[117]	802	ү(С-Н)	[118]
555	v(Cu-N)*	[112]	730	γ(C-H)	[117]	918	ρ(CH) + ν(CO)	[119]
723	γ(C-H)*	[117]	838	γ(С-Н)	[117]	968	v(CO)	[119]
784	γ(C-H)*	[117]	856	δ(С-Н)	[117]	1012	v(CC)	[118]
856	δ(С-Н)*	[117]	1037	δ(C-H))	[120]	1085	$ ho({ m CO}_2) + ho({ m NH}_2)$	[121]
1046	v(C-N)*	[13]	1136	δ(С-Н)	[117]	1126	v(CC)	[121]
1105	δ(C-H)*	[117]	1183	δ(С-Н)	[117]	1382	ω(CH ₂)	[119]
1147	δ(С-Н)*	[117]	1217	v(C-N)	[114]	1469	δ(С-Н)	[119]
1380	NO ₃ -	[122]	1342	v(C-N)	[114]	1596	v(C=O)	[119]

Tabela 3: Possíveis atribuições das bandas de absorção no FTIR para a amostra do cristal ternário FenSCu, comparada com os dados reportados na literatura para 1,10-Fenantrolina e Serina.

1432	v(C=N)*	[13]	1419	v(C-C)	[115]	2902	ν _s (C-H)	[119]
1496	v(C-C)*	[114]	1508	v(C-C)	[115]	3467	v _{AS} (N-H)	[119]
1519	v(C-C)*	[114]	1566	v(C=C)	[123]			
1587	v(C-C)*	[115]	1589	ν(C=N)	[123]			
1631	v(C=O)*	[13]	1620	v(C-C)	[115]			
3056	v(C-H)*	[84]						
3122	ν(H-N-H)*	[84]						
3213	ν(H-N-H)*	[124]						
3284	ν(H-N-H)*	[124]						
3500- 3700	v(OH…O)	[125]						

Notação para os modos: v – estiramento; δ – deformação angular no plano; γ – deformação angular fora do plano; ω – twisting; ρ – rocking

O espectro FTIR do complexo ternário, no intervalo compreendido entre 3500 a 3700 cm⁻¹, os modos vibracionais para as moléculas de água são ativos nesta região, porém devido à elevada absorção desta molécula no infravermelho uma sobreposição de bandas ocorre levando o não aparecimento de algumas vibrações [125]. Portanto, faz-se necessário a utilização de outras técnicas espectroscópicas vibracionais como o Raman, com a finalidade de determinar modos que são inativos nesta técnica e que podem se tornar ativos em outra.

4.4 Espectroscopia Raman em Temperatura Ambiente.

Os experimentos de espectroscopia Raman para o cristal FenSCu foram realizados no intervalo de três regiões, com a intenção de elucidar as possíveis bandas, são elas: 70 a 700 cm ⁻¹, 700 a 1200 cm ⁻¹ e 1200 a 1700 cm ⁻¹. Para este sistema cristalino não se encontra reportado na literatura nenhuma caracterização vibracional (Raman) até o momento.

Será apresentada nesta seção a atribuição aos modos vibracionais do complexo ternário a temperatura ambiente. A análise dos dados obtidos foi realizada por meio de comparações com conteúdo encontrado na literatura referente aos materiais precursores e semelhantes. A seguir, são apresentados os dados de espectroscopia Raman por região para melhor visualização dos resultados obtidos.

4.4.1 Região de 70 a 700 cm⁻¹

As vibrações em baixo número de onda no espectro Raman usualmente são denominadas modos externos ou modos de rede, por ser a região que está associada às informações estruturais do cristal. A observação desta região é fundamental, pois eventualmente podem ser alteradas por fatores extrínsecos, evidenciando transições e/ou transformações de fase do material [126]. Na Figura 32 é apresentado o espectro Raman do cristal FenSCu no intervalo espectral de 70 a 700 cm⁻¹ à temperatura ambiente, juntamente com as possíveis atribuições dos modos vibracionais.

A Tabela 4 mostra os modos de vibração Raman da primeira região (70-700 cm⁻¹) analisada. Na mesma tabela, encontram-se atribuições das bandas em correlação aos dados dispostos na literatura.

Para o cristal FenSCu, todas as bandas presentes na região inferior a 150 cm⁻¹, foram apontadas como modos externos ou modos de rede. A banda referente às vibrações do metal aparece em 490 cm⁻¹ ocasionado pelo acoplamento de duas deformações angulares, δ (OCuO) + δ (NCuN). Sócrates [84] descreve que regiões entre 380 e 550 cm⁻¹ são passíveis de se encontrar vibrações relacionadas aos modos do metal-nitrogênio. Já em regiões de 290-420 cm -¹ é característica de vibrações do modo metal-oxigênio, concordando com os resultados expostos por este estudo.



Figura 32: Espectro Raman para o cristal FenSCu a temperatura ambiente na região espectral de 70 a 700 cm -1.

A vibração encontrada em torno do número de onda 563 cm ⁻¹ está associada à deformação angular no plano para a ligação C-C-C δ (CCC), como reportado por Ramos, que aponta o número de onda 564 cm ⁻¹ para esta deformação [119].

Os modos vibracionais localizados em 607 cm^{-1} e 646 cm^{-1} , fazem referência aos modos de deformação angular no plano para os anéis aromáticos da molécula de 1,10 – Fenantrolina, sendo a primeira banda uma deformação simétrica e a segunda banda assimétrica [127, 128].

Região	Número de (Onda (cm ⁻¹)	Atribuições	Referências
	Experimental	Literatura		
m ⁻¹)	108 168	x<250	Modos de Rede	[84]
)0 c	265	269	ρ(OH) _{ser}	[119]
a 7(288	295	δ(CCO) _{ser}	[129]
70	410	400	δ(CCN)	[130]
ão (435	435	$\omega CC) + \delta(NCC)$	[131]
egi	490	482	$\delta(OCuO) + \delta(NCuN)$	[132]
a R	563	564	δ(CCC)	[119]
leir	607	607	δ(anel)	[127]
rim	646	642	δ _{as} (anel)	[128]
Ъ	662	661	δ(COO ⁻)	[133]

Tabela 4: Modos Raman para o cristal FenSCu no intervalo espectral de 70-700 cm⁻¹.

Notação para os modos: v – estiramento; δ – deformação angular no plano; γ – deformação angular fora do plano; ω – twisting; ρ – rocking.

4.4.2 Região de 700 a 1200 cm⁻¹

A Figura 33 mostra o espectro Raman para o complexo ternário FenSCu no intervalo espectral de 700 a 1200 cm⁻¹ à temperatura ambiente, juntamente com as possíveis atribuições dos modos exibidos pelo cristal.

Os modos vibracionais que são exibidos nos números de onda 727 cm⁻¹ e 741 cm⁻¹ caracterizam vibrações referentes aos modos *twisting* para as ligações C-H, ω (CH) que são presentes em moléculas orgânicas, como é o caso do aminoácido Serina e da molécula de 1,10-Fenantrolina.

Para o ligante Serina, as vibrações nos números de onda: 829 cm⁻¹, 1055 cm⁻¹ e 1102 cm⁻¹, são associadas ao modo twisting ω (CO), acoplamento de uma deformação angular δ (HNH) + modo rocking ρ (CH₂) e ao modo rocking ρ (NH₂), respectivamente.



Figura 33: Espectro Raman para o cristal FenSCu a temperatura ambiente na região espectral de 700 a 1200 cm -1.

Verifica-se o deslocamento desses modos quando comparados com os valores reportados na literatura para o material puro, tal fato pode estar relacionado à complexação do íon metálico com a molécula orgânica que induz esse efeito.

A Tabela 5 exibe as vibrações pertencentes ao cristal complexado com as atribuições em comparação com a literatura para a região observada.

Região	Número de (Onda (cm ⁻¹)	Atribuições	Referências
	Experimental	Literatura		
00)	727	728	ω(CH) _{ar}	[84]
a 12	742	763	ω(CH)	[84]
700	829	822	ω(CO) _{ser}	[127]
ăo (7	872	872	δ(NH ₂)	[131]
tegi	1020	1029	v(CN)	[134]
la R	1055	1050	v(NO ₃ ⁻)	[135]
gund [-1]	1102	1097	δ(HOC)	[119]
Seg	1145	1137	ρ(NH ₂)	[136]

Tabela 5: Modos Raman para o cristal FenSCu no intervalo espectral de 700-1200 cm⁻¹.

Notação para os modos: v – estiramento; δ – deformação angular no plano; γ – deformação angular fora do plano; ω – twisting; ρ – rocking.

4.4.3 Região de 1200 a 1700 cm⁻¹

A Figura 34 mostra o espectro Raman para o complexo ternário FenSCu no intervalo espectral de 1200 a 1700 cm⁻¹ à temperatura ambiente, juntamente com as possíveis atribuições dos modos exibidos pelo cristal.



Figura 34:Espectro Raman para o cristal FenSCu a temperatura ambiente na região espectral de 1200 a 1700 cm -1.

A banda mais intensa observada no número de onda 1447 cm⁻¹ é referente a um estiramento assimétrico v(CC), assim como o modo vibracional exibido no número de onda 1338 cm⁻¹ que pertence a um estiramento assimétrico v(CC). Esta mesma vibração foi apontada em um estudo com complexo de Cobre (II) ligados a molécula de 1,10-Fenantrolina em 1343 cm⁻¹ por Tamer e seus colaboradores[137].

Os últimos modos vibracionais para o espectro Raman do cristal FenSCu, são associadas a deformação angular no plano $\delta(NH_3)$ e o estiramento assimétrico v(CO), observados nos números de onda 1507 cm⁻¹ e 1622 cm⁻¹. Assim como nas demais regiões analisadas, a posição das bandas, e suas possíveis atribuições, encontram-se registradas na Tabela 6.

Região	Número de	Onda (cm ⁻¹)	Atribuições	Referências
	Experimental	Literatura		
) a	1210	1200	δ(CH)	[131]
120(1302	1312	ω(CH ₂)	[133]
ão (1 ⁻¹)	1338	1343	v(CC)	[137]
legi 0 cn	1447	1100-1500	v(CC)	[84]
ira H 170	1507	1509	δ(NH ₃)	[133]
rcei	1583	1596	$\delta(\rm NH_2)$	[136]
Te	1622	1630	v _{as} (CO)	[137]

Tabela 6: Modos Raman para o cristal FenSCu no intervalo espectral de 1200-1700 cm-1.

Notação para os modos: v – estiramento; δ – deformação angular no plano; γ – deformação angular fora do plano; ω – twisting; ρ – rocking.

É importante ressaltar que algumas regiões não foram mensuradas no espalhamento Raman para o cristal FenSCu, devido não apresentar vibrações para quaisquer grupos, exibindo somente ruídos no espectro.

4.5 Análises Térmicas (TG-DTA)

A amostra do cristal FenSCu foi submetida ao estudo das propriedades térmicas, sendo caracterizada por TG/DTA simultâneos. De início foi utilizado uma massa de 4,307 mg do cristal em pó, com faixa de 298 a 1173 K, como mostrado na Figura 35.

Conforme os dados apresentados na curva TG notam-se dois eventos na primeira região, compreendido entre 295 e 423 K, estes eventos podem ser atribuídos à saída do Nitrato,

correspondendo uma perda de 12,7% da massa inicial, equivalente a -0,547 mg e à saída da molécula de água com uma perda de 0,134 mg (3,11%).

Ainda referente à saída do Nitrato e da água do complexo cristalino, os picos endotérmicos localizados em 342 K e 403 K respectivamente na curva DTA possui total relação com o dado apresentado nessas temperaturas para a curva TG.



Figura 35: Curva TG/DTA do cristal ternário FenSCu.

Observando a região (II), nota-se que o intervalo que compreende as temperaturas de 423 a 673 K, o comportamento térmico apresentado pela curva TG indica uma decomposição de 21,7 % da massa inicial ou equivalente a -0,935 mg, a este atribui-se uma perda parcial de massa de 92,87 g/mol. A estes eventos atribui-se à perda referente aos compostos orgânicos presentes no complexo metálico. Os picos localizados na curva DTA (473 e 592K) evidenciam a saída da Serina e da 1,10-Fenantrolina no composto, assim como elucidam a decomposição do aminoácido em uma série de compostos intermediários que são gerados.

A região (III) apresentada na Figura 35 na curva TG, exibe o último evento de decomposição do material, a este evento é calculada uma perda de massa de 43,62% do peso inicial, ou ainda -1,879 mg, que equivale a uma massa molar de 186,66 g/mol. O pico
exotérmico presente na curva DTA em 735 K infere a perda de matéria referente ao material sintetizado e possível oxidação do metal.

Zhong e Zhong[138], citam que com relação aos compostos orgânicos que se complexam a íons metálicos, estes sob análises térmicas se decompõem em uma ou mais parcelas com a possibilidade de formarem moléculas intermediárias. Tal fato corrobora com os dados apresentados nas regiões (II e III) para as curvas TG-DTA. Com base nisto, nota-se que as decomposições nessas regiões totalizaram uma massa de 279,53 g/mol, este valor possui relação com a massa para os compostos orgânicos presentes no cristal (285,30 g/mol).

Por meio dos dados obtidos pelas análises térmicas nota-se que o cristal ternário de cobre (II) com Serina e 1,10-Fenantrolina possui estabilidade térmica por volta de 333 K (60 °C), visto que depois disso o material sofre perda de massa.

Fundamentado na estabilidade térmica do material sintetizado, e paralelo aos procedimentos adotados pela área da Medicina, infere-se que o comportamento térmico deste possível antitumoral se enquadra nos padrões exigidos em terapias que se utilizam de dispersões sólidas para dissipação de calor em tecidos tumorais, como por exemplo a hipertermia. Uma vez que as células tumorais são mais sensíveis ao calor que as células sadias, ao serem mortas a 42°C (315 K), enquanto as sadias resistem [139].

4.6 Difração de Raios X em Função da Temperatura

Diante do comportamento térmico observado nas análises de TG/DTA demonstrado pelo cristal ternário FenSCu, visto que o cristal exibiu uma perda de massa, fez –se necessário realizar difração de raios X em função da temperatura a fim de verificar possíveis transformações de fase do cristal, assim como a variação dos parâmetros de rede do sistema cristalino.

A Figura 36 apresenta os padrões de difração de raios X em função da temperatura no intervalo angular $2\theta = 5 - 40^{\circ}$ compreendendo a faixa de temperatura 303 - 493 K. Por meio dos difratogramas obtidos observa-se que com o aumento da temperatura verifica-se o desaparecimento e o surgimento de picos no intervalo analisado.

A Figura 37 exibe o padrão de difração de raios X em função da temperatura no intervalo angular $2\theta = 8 - 20^{\circ}$ na faixa de temperatura de 303 - 493 K, no qual é possível perceber alterações na estrutura do cristal com o aumento da temperatura. Observa-se que não há mudanças nos difratogramas até a temperatura de 413 K. As primeiras alterações no difratograma ocorrem após essa temperatura (423 - 443 K) com o surgimento de pico em 9,0°

(2 θ), bem como a perda de intensidade do plano (110) em aproximadamente 12,9° (2 θ), indicando sua estabilidade até a temperatura de 413 K.



Figura 36: Padrão de Difração de Raios X do cristal de 1,10- Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II) em função da temperatura de 30 a 220 °C, no intervalo de 5-40° (2θ).

Ainda nessa mesma faixa de temperatura (423 - 443 K) ocorre o desaparecimento e a redução da intensidade de picos em ângulos superiores a 10° (20), bem como o surgimento do pico em 14,7° (20). Tal fato exemplifica a formação de uma nova fase pela perda de água, e sugerimos que seja o material na sua forma anidra. Nas curvas de TG/DTA a eliminação da água de coordenação ocorre na temperatura em torno de 403 K, porém, esta água é eliminada por completo da estrutura do cristal em temperatura superior a 413 K como foi percebido pelo experimento de DRX em função da temperatura.



Figura 37: Padrão de Difração de Raios X do cristal de 1,10- Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II) em função da temperatura de 303 a 493 K, no intervalo de 8-20° (2θ).

Também é possível observar na Figura 37 o surgimento de um novo pico após a temperatura de 433 K em 17,3° (2 θ). Tal evento corrobora com a formação de uma nova fase no material estudado. Em temperaturas acima de 483 K é notado o alargamento dos picos, tal fato sugere a parcial amorfização do material.

Os dados de DRX em função da temperatura foram tratados pelo refinamento de estrutura utilizando o método de Rietveld, para observar a variação nos parâmetros de rede conforme o aumento da temperatura. A Figura 38 apresenta o valor dos parâmetros rede a, b e c de 303 °C a 413 K.



Figura 38: Parâmetros de rede a, b e c do cristal ternário FenSCu obtidos pelo refinamento de Rietveld em função da temperatura (Estrutura Triclínica, P1).

A partir da Figura 38, observa-se que devido ao efeito da dilatação térmica os parâmetros de rede a e b estão aumentando e no parâmetro de rede c houve um decréscimo. Nota-se que essas mudanças estão acontecendo em torno de 353 K o que pode estar relacionado à saída da molécula de Nitrato do sistema cristalino, corroborando com o que foi analisado nas curvas de TG-DTA. Além disso, esse efeito foi mais notável no parâmetro de rede b que teve uma variação média de 5,14 %, enquanto que os parâmetros de rede a e c variaram em média 4,17 % e 3,20 % respectivamente, demonstrando que o cristal possui comportamento anisotrópico.

Através da variação dos parâmetros de rede, observou-se também o comportamento do volume e dos ângulos α , β e γ com a mudança de temperatura (apresentado nas Figuras 39 e 40). Foi observado para o volume da célula unitária que o mesmo sofre um aumento

proporcional ao aumento da temperatura, mesmo comportamento foi observado para o ângulo γ , uma vez que os demais ângulos diminuem com o aumento da temperatura.



Figura 39: Volume da célula unitária do cristal ternário FenSCu obtidos pelo refinamento de Rietveld em função da temperatura.



Figura 40: Ângulos α, β e γ do cristal ternário FenSCu obtidos pelo refinamento de Rietveld em função da temperatura.

Após a transformação de fase pela perda de água de coordenação, realizou-se o refinamento pelo método Le Bail, apresentado na Figura 41, associado ao *software* GSAS, para validar os dados indexados no programa DASH 3.3.6.

Segundo a Figura 41 a indexação dos dados resultou nos seguintes parâmetros de rede para a nova fase do cristal ternário FenSCu: a=10,3716 Å, b=12,0690 Å, c=7,8659 Å, $\alpha=51,64^{\circ}$, $\beta=109,78^{\circ}$, $\gamma=103,86^{\circ}$ e V= 982,98 Å³. A curva ajustada pelo método Le Bail revela fator de R_{wp}= 9,73% e R_p= 7,04%, o qual possui valores aceitáveis de confiabilidade. Outro ponto a ser considerado é que após a transformação de fase, além do processo de desidratação que ocorreu, houve a permanência no sistema cristalino triclínico, com mesmo grupo espacial P1.



Figura 41: Padrão de difração de raios X em 493 K da nova fase do cristal ternário FenSCu pelo método Le Bail.

Pode-se concluir que quando submetido a temperaturas muito altas o cristal ternário sofre transformação de fase, da sua fase hidratada para a forma anidra, com tendência a amorfização. Tal fato implica em mudanças nas propriedades, como estabilidade térmica, arranjo molecular.

Baseados nesses resultados, percebe-se que o cristal ternário FenSCu, pode ser utilizado como agente antitumoral devido à sua estabilidade térmica ser superior à temperatura corporal 309 K (36 °C), como já pôde ser observado nas análises térmicas, e nos sistemas posteriores ser também utilizado na produção de medicamentos, uma vez que os cristais bem como os amorfos possuem atividade farmacológica e podem servir como matrizes sólidas para drogas serem dispersas.

4.7 Espectroscopia Raman em Função da Temperatura (294 a 433 K)

Nesta seção será apresentado e discutido os resultados em relação à espectroscopia Raman do cristal ternário FenSCu em função da temperatura, variando de 294 a 433 K. Para esta medida foram obtidos 3 espectros, nas seguintes faixas: 70 a 700 cm ⁻¹, 700 a 1800 cm ⁻¹ e 2700 a 3500 cm ⁻¹. Estes dados irão fornecer mais informações sobre a transformação de fase sugerida por meio da DRX em função da temperatura.

4.7.1 Região de 70 a 700 cm ⁻¹

A Figura 42 mostra o espectro Raman em função da temperatura para o sistema cristalino sintetizado no intervalo de 70 a 700 cm⁻¹. Nesta região do espectro algumas bandas analisadas são referentes aos modos externos do cristal e então poderá avaliar as modificações sofridas pelo material em função da temperatura.

No intervalo de temperatura de 294 a 433 K, são observadas mudanças nos espectros tais como, alongamentos de algumas bandas e desaparecimento de outras. Por exemplo, a banda localizada em 112 cm ⁻¹ perde intensidade e se alarga com o aumento da temperatura. Tal fato pode ser verificado no intervalo da temperatura de 294 e 433 K, o que corrobora com os dados de DRX em função da temperatura, no qual infere-se que a transformação de fase do material ocorre por volta de 423 K.

As modificações que ocorrem nas bandas dos espectros Raman em função da temperatura como no número de onda 183 cm⁻¹, pode estar associado a evaporação da molécula de água no complexo, uma vez que houve o desaparecimento dessa banda na temperatura de 423 K.



Figura 42: Espectro Raman do cristal ternário FenSCu em função da temperatura no intervalo de 70 a 700 cm -1.

Para as bandas localizadas em 435 cm⁻¹ e 563 cm⁻¹, pertencentes a ω (CC) + δ (NCC) e a deformação da ligação C-C-C [δ (CCC)] estas são alargadas e perdem a intensidade com o aumento da temperatura. Tal fato pode ser ocasionado devido o processo de desidratação, assim como a reestruturação molecular da forma hidratada para a forma anidra do sistema cristalino.

4.7.2 Região de 700 a 1800 cm ⁻¹

A Figura 43 exibe os espectros Raman em função da temperatura na região compreendida entre 700 a 1800 cm $^{-1.}$

O modo vibracional presente em 740 cm ⁻¹ referente a uma torção da ligação C-H [ω (CH)], sofre um deslocamento para menores números de onda (*down shift*) e ocorre redução

da intensidade em 423 K, que pode ser ocasionado devido o processo de saída da molécula de água.

A vibração localizada no número de onda 1049 cm⁻¹ atribuído ao íon nitrato, $v(NO_3^-)$ sofre um *down shift* e ocorre redução da intensidade em 423 K. Tal evento também pode ser ocasionado devido ao processo de desidratação.

Com o aumento da temperatura nota-se um alargamento e redução da intensidade para a vibração presente em 1316 cm⁻¹ pertencente a interação [ω (CH₂)]. Pode-se inferir que essas modificações que ocorrem são indícios da transformação de fase, o que causa uma alteração na estrutura do complexo ternário sintetizado.



Figura 43: Espectro Raman do cristal ternário FenSCu em função da temperatura no intervalo de 700 a 1800 cm⁻¹.

As bandas presentes em 1428 cm⁻¹, 1438 cm⁻¹ e 1457 cm⁻¹ fazem referência aos modos vibracionais de estiramento da ligação v(CC). Estes quando submetidos a temperaturas mais elevadas sofrem um *down shift*, há uma redução da intensidade das bandas e na temperatura de

423 K as duas primeiras bandas se unem em uma única vibração alargada. Evento esse que pode ser originado de uma parcial amorfização do material [84].

Através das informações obtidas nos espectros Raman em função da temperatura nas duas regiões, pode –se dizer que o material sofre uma transformação de fase por volta da temperatura de 423 K.

4.7.3 Região de 2700 a 3500 cm⁻¹

A Figura 44 apresenta os espectros Raman em função da temperatura no intervalo da região entre 2700 e 3500 cm⁻¹.



Figura 44: Espectro Raman do cristal ternário FenSCu em função da temperatura no intervalo de 2700 a 3500 cm⁻¹

Para esta região na Espectroscopia Raman em função da temperatura, tem-se a presença das vibrações associadas à ligação O-H, uma vez que este sistema cristalino sintetizado foi obtido na sua forma hidratada.

É notável que em todos os espectros as bandas sofreram alongamento bem como redução da intensidade, o que leva a uma parcial amorfização. No número de onda que compreende a vibração referente à molécula de água em 3246 cm ⁻¹ [v (OH)], percebe-se o desaparecimento desta na temperatura de 393 K, o que de fato confirma a evaporação da água do complexo e o surgimento da nova fase.

Para as vibrações em número de onda 2932 cm ⁻¹ e 3290 cm ⁻¹, referente ao estiramento das ligações $[v_{as} (CH_2)]$ e $[v_{as} (NH_2)]$ respectivamente, foi observado redução da intensidade e desparecimento de suas bandas a partir da temperatura 393 K. Tal evento, pode ser ocasionado pela reorganização estrutural devido a saída de água do complexo.

4.8 Análises Magnéticas

Com o intuito de verificar a possibilidade de utilizar o cristal ternário FenSCu em terapias de câncer por meio do magnetismo molecular [140], foram realizadas medidas de magnetização em função da temperatura e na presença de um campo externo aplicado, que serão descritas a seguir.

4.8.1 Magnetização em função da temperatura

A medida de magnetização em função da temperatura no modo *Field Cooled (FC)* – *resfriamento com campo aplicado*- foi realizada em um campo de 10 kOe, tendo como objetivo principal analisar a propriedade magnética do cristal FenSCu. A Figura 45 mostra a dependência da suscetibilidade magnética (χ_m), com a temperatura no campo aplicado.

Tal fato caracteriza um modelo de um sistema paramagnético, uma vez que na presença de um campo magnético externo os elétrons do material se alinham, este alinhamento dos dipolos elementares atômicos resulta em uma magnetização positiva e dependente da temperatura. [141].

Na Figura 45 inferimos que com o aumento da temperatura há um decréscimo na susceptibilidade magnética ocasionado pela desordem no sistema, isto quer dizer que a agitação térmica reduz a resposta magnética do material, por tornar aleatória a orientação dos dipolos magnéticos. Esta diminuição pode estar relacionada também com a contribuição diamagnética dos compostos orgânicos. O gráfico obtido para o material por meio da medida obedece a Lei de Curie-Weiss, que descreve o comportamento magnético de materiais paramagnéticos, pois a susceptibilidade magnética (χ_m) diminui com o aumento da temperatura.



Figura 45: Susceptibilidade magnética (χm) em função da temperatura no modo Field Cooled com ajuste usando a Lei de Curie-Weiss, em campo magnético externo de 10 kOe.

A partir dos dados obtidos na Figura 45 e de acordo com o ajuste baseado na Lei de Curie-Weiss, determinada pela curva de susceptibilidade magnética (χ_m), foi possível obter a constante de Curie (C), a temperatura de Curie-Weiss (θ_{CW}) e o valor do momento magnético efetivo (μ_{eff}). Tais resultados estão dispostos na tabela 7.

Parâmetros Magnéticos			
H (kOe)	С	θ _{CW} (K)	μ _{eff} (μ _B)
10	0,3315	-0,2033	1,63

Tabela 7: Parâmetros magnéticos do cristal ternário de 1,10- Fenantrolina, Serina complexado com Cobre (II).

O valor baixo positivo apresentado na Tabela 7 para a constante de Curie confirmam de fato que o sistema é paramagnético. Já o valor pequeno e negativo demonstrado para a temperatura de Curie-Weiss estabelece a possível existência de interação de natureza antiferromagnéticas. Essas propriedades magnéticas obtidas e apresentadas possuem semelhanças com resultados de estudos de materiais a base Cobre dispostos na literatura [142].

Vale ressaltar que através do valor obtido experimentalmente para o momento magnético efetivo para o complexo ternário (1,63 μ_B) pode-se deduzir que esse valor é possivelmente proveniente do íon Cu²⁺, uma vez que se encontra na literatura que o mesmo tem momento magnético variando entre 1,8 e 2,1 μ_B . Além disso, é reportado alguns complexos que contém o metal Cobre e apresentam valores de momento magnético efetivo semelhante ao encontrado nesse estudo [106, 143].

4.8.2 Magnetização em função de um campo externo aplicado

A medida de magnetização em função de um campo externo aplicado foi realizada a 2 K. A Figura 46 apresenta a curva de magnetização. Observa-se que essa curva tem um comportamento parcialmente retilíneo com características sigmoide, isso é devido ao aumento da magnetização para o cristal ternário FenSCu conforme a força do campo externo é aplicada.



Figura 46: Susceptibilidade magnética em função de um campo externo aplicado a 2 K.

O aumento da magnetização ocorre devido à aplicação do campo externo, dado que quando se aplica um campo magnético nos materiais surge uma magnetização no mesmo sentido do campo aplicado. Na ausência de um campo, os momentos magnéticos estão orientados ao acaso, sendo que a porcentagem dos momentos magnéticos que se alinham vai depender da intensidade do campo aplicado, justificando assim o aumento da magnetização em maiores campos externos.

Baseado nas propriedades magnéticas observadas para o cristal ternário FenSCu, verifica-se que o mesmo pode ser utilizado possivelmente em carreadores de drogas a partir da técnica *Drug Delivery* onde otimiza a liberação controlada de fármacos em sítios-direcionados (região tumoral) quando aplicado um campo externo[144]. Considerando também que materiais que possuem íons metálicos e moléculas orgânicas essenciais, como os aminoácidos, têm a capacidade de ligar-se por diversos tipos de interações com enzimas, proteínas e ácido nucléico.

4.9 Testes Biológico e Químico

Será apresentado a seguir os testes biológico e químico do cristal ternário FenSCu, que dizem respeito às propriedades medicinais pertencentes ao complexo em estudo.

4.9.1 Ensaio de Solubilidade

Para analisar o perfil de solubilidade do cristal FenSCu foi realizado o ensaio de solubilidade em água. Utilizou-se uma curva analítica para a quantificação do complexo cristalino, usando o método dos mínimos quadrados, conforme representado na Figura 47. A figura mostra a curva padrão obtida através das concentrações das soluções do cristal FenSCu e suas absorbâncias em 606 nm, como estão descritas na Tabela 8.

A equação da reta obtida por meio da curva analítica, permitiu a quantificação das concentrações (mg/ml) do cristal ternário em água deionizada (pH=7). Tais concentrações encontram-se em função do tempo (min) sintetizadas na Figura 48 e exibidas na Tabela 9.

A solubilidade é um parâmetro termodinâmico que está associado com a quantidade de um soluto que se dissolve em um determinado solvente, sendo esse um fator determinante para a liberação e absorção de um fármaco. Para fármacos, a solubilidade está diretamente ligada à sua eficiência, o que justifica a busca por medicamentos mais solúveis visando um melhor desempenho desses compostos, como por exemplo os antitumorais.



Figura 47: Curva analítica para determinação da solubilidade do cristal FenSCu em água

Tabela 8: Concentração média das soluções do cristal FenSCu utilizadas para a construção da curva analítica(Absorbância = 606 nm).

Pontos	Absorbância (606 nm)	Concentrações do cristal FenSCu (mg/ml)
1	0,180545	2
2	0,259986	3
3	0,347863	4
4	0,424840	5
5	0,501274	6
6	0,553770	7
7	0,605607	8
8	0,665860	9
9	0,729370	10 (solução mãe)

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o cristal ternário FenSCu apresenta uma solubilidade inicial de 11,52 mg/ml e segue com aumentos gradativos ao longo do tempo de 240 minutos, o que pode ser verificado na Tabela 9. Foi observado que o cristal alcança um ponto de equilíbrio em 180 minutos com solubilidade máxima de 21,61mg/ml. O aumento da

solubilidade do material com o decorrer do tempo, pode ser explicado devido a fatores como: arranjo espacial das moléculas e presença de compostos orgânicos no sistema cristalino.

Quando comparado com outros tipos de fármacos utilizados no tratamento do câncer, como a cisplatina, o cristal FenSCu apresentou um melhor perfil de solubilidade, uma vez que que a Cisplatina possui baixa solubilidade em água, com um valor de 2,5 mg/ml, necessitando ser diluído em uma solução de cloreto de sódio quando administrada em pacientes com câncer. Uma pequena diferença é observada para o sistema cristalino FenSCu em relação a cisplatina, onde o mesmo apresenta uma solubilidade de 21,61 mg/ml e não requer a presença de outro solvente para sua dissolução m meio aquoso.



Figura 48: Perfil de solubilidade do cristal ternário FenSCu.

Tempo (min)	Concentração do cristal FenSCu (mg/ml)
0	11,52
1	20,72
2	20,72
3	21,08
4	21,16
5	21,23
6	21,24
7	21,26
8	21,34
9	21,39
10	21,46
30	21,73
60	21,46
120	21,56
180	21,61
210	21,61
240	21,61

 Tabela 9: Concentração do cristal FenSCu em função do tempo.

Baseado no perfil de solubilidade para o cristal FenSCu verifica-se que o material apresenta uma solubilidade considerada boa, visto que esta é uma das exigências para medicamentos, uma vez que se necessita de uma solubilidade considerável para que dispersões sólidas possam ativar seus princípios farmacológicos, como é o caso de sistemas cristalinos.

4.9.2 Avaliação da atividade antitumoral (*in vitro*)

Foram realizados testes de citotoxicidade (*in vitro*) a fim de investigar a atividade antitumoral do cristal FenSCu. Os testes de citotoxicidade são de fundamental relevância para o estudo biológico de um composto como possível fármaco anticancerígeno, para isso foi utilizado a linhagem celular HCT -116, célula de câncer colorretal. O HCT-116 é uma linha celular comumente usada para estudar a biologia do câncer. Está é uma linhagem muito invasiva e altamente móvel, o que aumenta a capacidade metastática dessa linhagem [145].

Para avaliar a atividade antitumoral, as células foram incubadas com diferentes concentrações do cristal FenSCu e determinada a IC₅₀. Este valor foi obtido a partir de um gráfico de interpolação (Figura 49) da curva dose-resposta do cristal FenSCu frente a linhagem celular HCT-116.



Figura 49: Curva dose-resposta para o cristal FenSCu frente linhagem celular HCT-116.

Diante dos dados obtidos através da análise de regressão logarítmica, verificou-se que a IC_{50} para as células HCT-116 foi de 2,14 μ M. Fazendo um comparativo com outras substâncias antineoplásicas, o cristal FenSCu apresentou um resultado bastante eficaz no que se refere a sua atividade citotóxica, como pode ser observado na Figura 50.

Ao comparar a atividade citotóxica de alguns compostos que são utilizados no tratamento do câncer (Figura 50) como por exemplo a Oxaliplatina e 5-Fluoracila com o cristal FenSCu, observa-se que os complexo ternário possui uma atividade superior, este evento pode ser explicado devido alguns desses compostos não possuírem ligantes orgânicos que ampliam sua ação antitumoral. Quando comparado a cisplatina, o complexo pioneiro muito eficiente para o tratamento do câncer que possui IC₅₀ para células HCT-116 igual a 8,3, o cristal FenSCu apresentou um melhor resultado [146-148].

Sabendo que de acordo com Shier [149], os compostos exibindo atividade IC_{50} na faixa de 10 a 25 μ M são considerados agentes anticancer fracos, os com atividade IC_{50} entre 5 e 10 μ M são moderados e os compostos com atividade abaixo de 5 μ M são considerados agentes fortes. Nesse sentido, o complexo em estudo apresentou atividade forte contra a linhagem celular HCT-116.



Figura 50: Comparação da atividade citotóxica (IC₅₀) de vários antitumorais frente a linhagem celular HCT -116

Uma explicação favorável para este acontecimento é a presença do Cu^{2+} no sistema cristalino sintetizado e os demais compostos não possuirem esse metal na sua estrutura, alem de que a coordenação de compostos polipridinicos e agentes quelantes potencializou a atividade citotoxica do íon Cu^{2+} , deduzindo assim que os ligantes possuem bastante influencia na atividade antitumoral.

No cristal ternario sintetizado, a 1,10-Fenantrolina é um ligante que possui a capacidade de se inserir no meio das bases nitrogenadas da fita dupla do DNA, atuando como intercalador e a serina devido aos seus grupos funcionais promove ao sistema cristalino uma facilidade de se ligar ao DNA por meio de ligações de hidrogênio[150].

5. CONCLUSÕES

O Cristal ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II) foi obtido pela técnica de evaporação lenta do solvente, após um período de 7 dias, em pH 8,6. A medida de MEV mostrou que a superfície do cristal apresenta defeitos interfaciais, como detectou por EDS a presença do íon Cu²⁺e dos demais elementos utilizados para a síntese do material.

A análise de DRX em conjunto com o refinamento de *Rietveld* a temperatura ambiente comprovou a cristalização no sistema triclínico com grupo espacial P1 para o cristal, contendo 2 moléculas por célula unitária.

As análises de FTIR e Raman comprovam que as moléculas de 1,10-Fenantrolina e Serina se encontram coordenadas ao átomo de cobre. Ocorre o surgimento de vibrações características da Fenantrolina coordenada ao Cobre.

Nas curvas de TG/DTA observou-se que o cristal ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II) apresenta estabilidade térmica em temperaturas até 60 °C, seguida por uma transformação de fase ocasionado pela perda de água.

As medidas de DRX em função da temperatura comprou a transformação de fase do cristal. Por meio do refinamento *Le Bail* verificou-se que a nova fase do material apresentou o mesmo sistema da fase hidratada, ou seja, triclínico com grupo espacial P1.

A espectroscopia Raman em função de altas temperaturas confirma a transformação de fase como mostrado no DRX com temperatura, visto que as bandas referentes aos modos externos do material se deslocam para maiores frequências.

As análises magnéticas apontaram o comportamento paramagnético do cristal ternário obtendo um valor positivo para a constante de Curie (0,3315). Os dados obtidos mostraram ainda que existem interações de momentos antiferromagnéticos na estrutura cristalina, devido ao valor pequeno e negativo da temperatura de Curie-Weiss (-0,2033). Salienta-se que o momento magnético efetivo do material é semelhante com o valor teórico exibido pelo íon Cu $^{2+}$.

A atividade citotóxica do cristal FenSCu foi comprovada por meio de teste de citotoxicidade em linhagem tumoral HCT-116. Os dados mostraram uma $IC_{50} = 2,14 \mu M$, sendo esse valor bastante promissor para a produção de fármacos a base deste sistema cristalino.

O ensaio de solubilidade para o cristal ternário FenSCu, mostrou uma rápida solubilidade no decorrer dos 240 minutos, alcançando uma solubilidade máxima de 21,61

mg/ml em 180 minutos. Quando comparado com outros compostos utilizados no tratamento do câncer, o cristal ternário mostrou uma boa solubilidade em água, não sendo necessário o uso de outro agente para dissolução do material.

Considerando os resultados obtidos, demonstrados e comparados com a literatura, constata-se que o cristal ternário de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II), possui algumas das características exigidas em fármacos utilizados contra o câncer, como estabilidade térmica, variabilidade estrutural. Nesse âmbito, pode-se afirmar que o sistema ternário sintetizado nesse estudo é um bom candidato a ser utilizado na produção de fármacos ou agentes cancerígenos.

6. PERSPECTIVAS

- † Avaliar o comportamento vibracional dos átomos por Espectroscopia Raman em baixas temperaturas;
- † Avaliar a toxicidade do cristal ternário em células normais, por meio de ensaios de toxicidade;
- † Aplicar o complexo cristalino em outras células tumorais extraídas e cultivadas *in vitro*;
- † Sintetizar novos cristais ternários de 1,10-Fenantrolina, substituindo o aminoácido e o metal,
 fazendo ainda o estudo das propriedades físicas e químicas destes sistemas cristalinos;
- Produzir novos materiais a partir do cristal de 1,10-Fenantrolina e Serina complexado com Cobre (II), juntamente com polímeros (Galactomanana, Quitosana, Xantana, Colágeno e Alginato de Sódio) para obtenção de depósitos/aprovação de patentes.

REFERÊNCIAS

- 1. Maliska, A.M., *Microscopia eletrônica de varredura*. Florianópolis: Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- 2. Neidle, S. and D.E. Thurston, *Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies.* Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(4): p. 285.
- 3. Benite, A.M.B.M., *Considerações sobre a química bioinorgânica medicinal*. Revista eletrônica de Farmácia, 2007. **4**(2).
- 4. Saúde, M.d., Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2017, INCA RJ.
- 5. Alberts, B., et al., *Fundamentos da biologia celular*. 2002: Artmed Editora.
- 6. Katzung, B.G. and A.J. Trevor, *Farmacologia Básica e Clínica-13*. 2017: McGraw Hill Brasil.
- 7. Wong, E. and C.M. Giandomenico, *Current status of platinum-based antitumor drugs*. Chemical reviews, 1999. **99**(9): p. 2451-2466.
- 8. Rosenberg, B., et al., *Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents.* Nature, 1969. **222**(5191): p. 385.
- 9. Uma, V., M. Elango, and B.U. Nair, *Copper (II) terpyridine complexes: effect of substituent on DNA binding and nuclease activity.* European journal of inorganic chemistry, 2007. **2007**(22): p. 3484-3490.
- 10. Arkin, M., et al., *Rates of DNA-mediated electron transfer between metallointercalators*. Science, 1996. **273**(5274): p. 475-480.
- 11. Santhakumar, P. and M.N. Arumugham, *Synthesis, Characterization of Copper (II) Complex with Mixed Ligands of 1, 10-phenanthroline, L-Phenylalanine and Thiourea: Studies on DNA Binding, Nuclease and Biological Activities.* Int. J. Chem. and Analy. Scie, 2012. **3**(8).
- 12. Reis, J.P.B., *Complexos de rutênio (II) com potenciais atividades antitumorais: síntese, caracterização e ensaios biológicos.* 2013.
- 13. Vušak, D., et al., Synthesis and crystal structure of solvated complexes of copper (II) with serine and phenanthroline and their solid-state-to-solid-state transformation into one stable solvate. Crystal Growth & Design, 2017. **17**(11): p. 6049-6061.
- 14. Moreno-Esparza, R., et al., *Aqua (1, 10-phenanthroline)(L-serinato) copper (II) Nitrate.* Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, 1995. **51**(8): p. 1505-1508.
- Guo, Z. and P.J. Sadler, *Metals in medicine*. Angewandte Chemie International Edition, 1999. 38(11): p. 1512-1531.
- 16. Barry, N.P. and P.J. Sadler, *Exploration of the medical periodic table: towards new targets*. Chemical communications, 2013. **49**(45): p. 5106-5131.
- 17. Higby, G.J., *Gold in medicine*. Gold bulletin, 1982. **15**(4): p. 130-140.
- 18. Klasen, H., A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. Burns, 2000. **26**(2): p. 131-138.
- 19. Rosenberg, B. and L. VanCamp, *The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds*. Cancer Research, 1970. **30**(6): p. 1799-1802.
- 20. Zhang, C.X. and S.J. Lippard, *New metal complexes as potential therapeutics*. Current opinion in chemical biology, 2003. **7**(4): p. 481-489.
- 21. Sadler, P., *Metal complexes in medicine: design and mechanism of action.* Journal of Inorganic Biochemistry, 1997. **67**(1-4): p. 4-4.

- 22. Yodoshi, M., M. Odoko, and N. Okabe, *Structures and DNA-binding and cleavage properties of ternary copper (II) complexes of glycine with phenanthroline, bipyridine, and bipyridylamine*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 2007. **55**(6): p. 853-860.
- 23. Zhang, S. and J. Zhou, *Ternary copper (II) complex of 1, 10-phenanthroline and L-glycine: crystal structure and interaction with DNA*. Journal of Coordination Chemistry, 2008. **61**(15): p. 2488-2498.
- 24. Silva, P.P., Síntese, caracterização físico-química e estudo da atividade antitumoral de complexos ternários de Cu (II) com um antibiótico e uma alfa, alfa-diamina e de Ru (II) com alfa, alfa-diaminas. 2013.
- 25. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods.* International journal of cancer, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
- 26. Maramaldi, P., S. Dungan, and N.L. Poorvu, *Chapter 3; Cancer treatments*. Journal of gerontological social work, 2008. **50**(S1): p. 45-77.
- 27. Kufe, D.W., et al., Holland-Frei Cancer Medicine 8. Vol. 8. 2010: PMPH-USA.
- 28. Von Minckwitz, G. and M. Martin, *Neoadjuvant treatments for triple-negative breast cancer (TNBC)*. Annals of oncology, 2012. **23**(suppl_6): p. vi35-vi39.
- 29. Oliveira, T.R.d., Estudo da hipertermia como agente de controle e liberação de quimioterápicos: análise e desenvolvimento de dispositivos de aquecimento. 2014, Universidade de São Paulo.
- 30. Chen, Q., et al., *Tumor microvascular permeability is a key determinant for antivascular effects of doxorubicin encapsulated in a temperature sensitive liposome*. International Journal of Hyperthermia, 2008. **24**(6): p. 475-482.
- 31. Baronzio, G., et al., *A brief overview of hyperthermia in cancer treatment*. J Integr Oncol, 2014. **3**(1): p. 1-10.
- 32. Jordan, A., et al., *Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles.* Journal of Magnetism and Magnetic materials, 1999. **201**(1-3): p. 413-419.
- 33. Colombo, R., et al., *Multicentric study comparing intravesical chemotherapy alone and with local microwave hyperthermia for prophylaxis of recurrence of superficial transitional cell carcinoma.* Journal of clinical oncology, 2003. **21**(23): p. 4270-4276.
- 34. Ponce, A.M., et al., *Magnetic resonance imaging of temperature-sensitive liposome release: drug dose painting and antitumor effects.* Journal of the National Cancer Institute, 2007. **99**(1): p. 53-63.
- 35. Zagar, T.M., et al., *Hyperthermia combined with radiation therapy for superficial breast cancer and chest wall recurrence: a review of the randomised data.* International Journal of Hyperthermia, 2010. **26**(7): p. 612-617.
- 36. Szasz, A., N. Szasz, and O. Szasz, *Oncothermia: principles and practices*. 2010: Springer Science & Business Media.
- 37. Dervan, P.B., *Molecular recognition of DNA by small molecules*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2001. **9**(9): p. 2215-2235.
- 38. Zeglis, B.M., V.C. Pierre, and J.K. Barton, *Metallo-intercalators and metallo-insertors*. Chemical Communications, 2007(44): p. 4565-4579.
- 39. Sigman, D., et al., Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1, 10-phenanthroline. cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(24): p. 12269-12272.
- 40. Saibert, C., Interação e clivagem de DNA por complexos binucleares de cobre (II) com ligantes contendo o grupo triazina e cadeias laterais funcionalizadas. 2015.

- 41. Biver, T., F. Secco, and M. Venturini, *Mechanistic aspects of the interaction of intercalating metal complexes with nucleic acids*. Coordination Chemistry Reviews, 2008. **252**(10-11): p. 1163-1177.
- 42. Turel, I. and J. Kljun, *Interactions of metal ions with DNA, its constituents and derivatives, which may be relevant for anticancer research.* Current topics in medicinal chemistry, 2011. **11**(21): p. 2661-2687.
- 43. Keene, F.R., J.A. Smith, and J.G. Collins, *Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids*. Coordination Chemistry Reviews, 2009. **253**(15-16): p. 2021-2035.
- 44. Boer, D.R., A. Canals, and M. Coll, *DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes*. Dalton Transactions, 2009(3): p. 399-414.
- 45. Santini, C., et al., Advances in copper complexes as anticancer agents. Chemical reviews, 2013. **114**(1): p. 815-862.
- 46. Abbehausen, C., Desenvolvimento de compostos de coordenação com atividades antibacterianas e antitumorais, e interações com biomoléculas. 2014.
- 47. Medeiros, W.M.T.Q.d., *Síntese e caracterização de complexo tetranuclear de cobre com o ligante resorcinareno.* 2014, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- 48. Kellett, A., et al., *Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper (II) complexes incorporating o-phthalate and 1, 10-phenanthroline or 2, 2'-dipyridyl.* Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(3): p. 564-576.
- 49. Sadler, P.J. and Z. Guo, *Metal complexes in medicine: design and mechanism of action*. Pure and Applied Chemistry, 1998. **70**(4): p. 863-871.
- 50. Callister, W.D. and D.G. Rethwisch, *Materials science and engineering: an introduction*. Vol. 7. 2007: John Wiley & Sons New York.
- 51. Benz, K.-W. and W. Neumann, *Introduction to crystal growth and characterization*. 2014: John Wiley & Sons.
- 52. Kubota, N. and J. Mullin, *A kinetic model for crystal growth from aqueous solution in the presence of impurity.* Journal of Crystal Growth, 1995. **152**(3): p. 203-208.
- 53. Mullin, J.W., *Crystallization*. 2001: Elsevier.
- 54. Vesselinov, M.I., *Crystal growth for beginners: fundamentals of nucleation, crystal growth and epitaxy.* 2016: World scientific.
- 55. Dirksen, J. and T. Ring, Fundamentals of crystallization: kinetic effects on particle size distributions and morphology. Chemical Engineering Science, 1991. **46**(10): p. 2389-2427.
- 56. Hahn, T. and M. Buerger, *The crystal structure of diglycine hydrochloride*, 2 (*C2H5O2N*). *HCl*. Z Kristallogr, 1957. **108**: p. 419-453.
- 57. Chauhan, C.K., *Growth and characterization of struvite and related crystals*. 2011, Saurashtra University.
- 58. Pamplin, B.R., *Crystal Growth: International Series on the Science of the Solid State*. 2013: Elsevier.
- 59. Pecharsky, V. and P. Zavalij, *Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials*. 2008: Springer Science & Business Media.
- 60. Cullity, B.D., *Elements of X-ray Diffraction*. 2001.
- 61. da Silva Lima, R., J.C. Afonso, and L.C.F. Pimentel, *Raios-X: fascinação, medo e ciência*. Quim. Nova, 2009. **32**(1): p. 263-270.
- 62. Arruda, W.O., *Wilhelm Conrad Röntgen: 100 anos da descoberta dos raios X.* Arq Neuropsiquiatr, 1996. **54**(3): p. 525-31.
- 63. Seliger, H.H., Wilhem Conrad Röntgen and the glimmer of light. Physics Today, 1995.48: p. 25-31.

- 64. Jaskolski, M., Z. Dauter, and A. Wlodawer, A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. The FEBS journal, 2014. **281**(18): p. 3985-4009.
- 65. Bragg, W.H. and W.L. Bragg, *The reflection of X-rays by crystals*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 1913. **88**(605): p. 428-438.
- 66. Rietveld, H., *A profile refinement method for nuclear and magnetic structures*. Journal of applied Crystallography, 1969. **2**(2): p. 65-71.
- 67. Will, G., Powder diffraction: The Rietveld method and the two stage method to determine and refine crystal structures from powder diffraction data. 2006: Springer Science & Business Media.
- 68. Young, R.A., *The rietveld method*. Vol. 5. 1993: International union of crystallography.
- 69. Kim, Y.-I. and F. Izumi, *Structure Refinements with a new version of the Rietveld-Refinement program RIETAN*. Journal of the Ceramic Society of Japan, 1994. **102**(1184): p. 401-404.
- 70. Dos Santos, A.O., Difração de raios-X de n-feixes na caracterização estrutural de monocristais sob a ação de temperatura e campo elétrico externo. 2006.
- 71. Le Bail, A., H. Duroy, and J. Fourquet, *Ab-initio structure determination of LiSbWO6 by X-ray powder diffraction*. Materials Research Bulletin, 1988. **23**(3): p. 447-452.
- 72. MOURA, G.M.d., Sais de L-Histidina: crescimento e caracterização por Difração de raios-X. 2015.
- 73. KESTENBACH, H.-J. and W.J. BOTTA FILHO, *Microscopia eletrônica: transmissão e varredura*. São Paulo: Associação Brasileira de Metais, 1994.
- 74. Mannheimer, W.A., *Microscopia dos materiais: uma introdução*. 2002: Editora Epapers.
- 75. Wey, J. and P. Karpinski, *Batch crystallization*, in *Handbook of Industrial Crystallization*. 2002, Elsevier. p. 231-248.
- 76. Reimer, L. and S.E. Microscopy, *Physics of Image formation and Microanalysis*. Scanning Electron Microscopy, (Spinger, Berkin), 1985.
- 77. Duarte, L.d.C., et al., *Aplicações de microcospia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas exemplos brasileiros.* Pesquisas em Geociências. Porto Alegre, RS. Vol. 30, n. 2 (2003), p. 3-15., 2003.
- 78. Beanland, R., P. Goodhew, and J. Humphreys, *Electron Microscopy and Analysis*. 2001, Taylor and Francis, London, UK.
- 79. Nagatani, T.-c., *Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field-emission source and in-lens system.* Scanning Microsc., 1987. 1: p. 901-909.
- 80. Fifield, F.W., *Principles and practice of analytical chemistry*. 2000: Blackwell science ltd.
- 81. Stewart, B., *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. 2004, John Wiley & Sons, Ltd.: Sussex.
- 82. Leite, J.G., *Aplicação das técnicas de espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à preservação do património.* 2008.
- 83. Dourado, E., *Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio*. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas. Rio de Janeiro-Dezembro–2006, 2006.
- 84. Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 2004: John Wiley & Sons.

- Strutt, J., XXXVI. On the light from the sky, its polarization and colour. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1871. 41(273): p. 274-279.
- 86. Sala, O., Fundamentos da espectroscopia raman no infravermelho. 1996.
- 87. Larkin, P., Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. 2017: Elsevier.
- 88. Ferraro, J.R. and K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy'' Academic Press. Inc.* 1994, Harcourt Brace & Company, Publishers: San Francisco, CA.
- 89. Smith, G.D. and R.J. Clark, *Raman microscopy in art history and conservation science*. Studies in Conservation, 2001. **46**(sup1): p. 92-106.
- 90. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*. 2001: McGraw-Hill Interamericana de España.
- 91. McCreery, R.L., *Raman spectroscopy for chemical analysis*. Vol. 225. 2005: John Wiley & Sons.
- 92. Nguyen, D.N., C. Clasen, and G. Van den Mooter, *Pharmaceutical applications of electrospraying*. Journal of pharmaceutical sciences, 2016. **105**(9): p. 2601-2620.
- 93. Brown, M.E., *Introduction to thermal analysis: techniques and applications*. Vol. 1. 2001: Springer Science & Business Media.
- 94. Mothé, C. and A. Azevedo, *Análise térmica de materiais Artliber Editora*. São Paulo, Brazil, 2009.
- 95. Gabbott, P., Principles and applications of thermal analysis. 2008: John Wiley & Sons.
- 96. Ionashiro, M., Princípios básicos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial. Araraquara, Brasil: Giz Editorial, 2004.
- 97. Hatakeyama, T. and Z. Liu, *Handbook of thermal analysis*. 1998: Wiley.
- 98. Raje, N., et al., Impurity characterization and thermal decomposition mechanism of ammonium diuranate during in-situ synthesis of U3O8 using simultaneous TG-DTA-FTIR and PXRD measurements. Journal of analytical and applied pyrolysis, 2014. **109**: p. 21-28.
- 99. Earnshaw, A., *Introduction to magnetochemistry*. 2013: Elsevier.
- 100. Kingery, W.D., Introduction to ceramics. 1976.
- 101. Cullity, B.D. and C.D. Graham, *Introduction to magnetic materials*. 2011: John Wiley & Sons.
- 102. Buschow, K.H.J. and F.R. Boer, *Physics of magnetism and magnetic materials*. Vol. 7. 2003: Springer.
- 103. Getzlaff, M., Fundamentals of magnetism. 2007: Springer Science & Business Media.
- 104. Narlikar, A.V., Frontiers in magnetic materials. 2005: Springer.
- 105. Huheey, J.E., *Principles of structure and reactivity*. 1983: Harper & Row.
- 106. Carlin, R.L., Magnetochemistry. 2012: Springer Science & Business Media.
- 107. Souza, K.C., N.D. Mohallem, and E.M. Sousa, *Mesoporous silica-magnetite nanocomposite: facile synthesis route for application in hyperthermia.* Journal of solgel science and technology, 2010. **53**(2): p. 418-427.
- Commision, B.P., British pharmacopoeia. The Stationery Office., London UK, 2009: p. 10181-6.
- 109. Molin, F., Síntese e caracterização de ligantes contendo a unidade piridiltetrazol e estudo de coordenação com Cu. 2003.
- 110. LEE, J.D., Química inorgânica concisa. Ed. Edgard Blucher, São Paulo, 1999.
- 111. Kumar, M.S., et al., *Structural characteristics and second harmonic generation in Lthreonine crystals.* Journal of crystal growth, 2006. **286**(2): p. 451-456.

- 112. Sharma, S., et al., Synthesis, characterization, and crystal structure of RNA targeted land d-phenylalanine-(1, 10-phen)-copper (ii) conjugate complexes: comparative in vitro RNA binding profile of enantiomers and their biological evaluation by morphological studies and antibacterial activity. RSC Advances, 2016. **6**(83): p. 79372-79382.
- 113. Awad, D.J., et al., *1, 10-Phenanthroline-dithiolate mixed ligand transition metal complexes. Synthesis, characterization and EPR spectroscopy.* Inorganica Chimica Acta, 2010. **363**(7): p. 1488-1494.
- 114. Ueno, K. and A.E. Martell, *Infrared Study of Metal Chelates of Bisacetylacetoneethylenediimine and Related Compounds*. The Journal of Physical Chemistry, 1955. **59**(10): p. 998-1004.
- 115. Campos-Vallette, M., et al., *Infrared spectrum of the bis-(1, 10-phenanthroline) Cu (I)* and Cu (II) perchlorate complexes. Vibrational spectroscopy, 1996. **12**(1): p. 37-44.
- Marković, M., N. Judaš, and J. Sabolović, *Combined Experimental and Computational Study of cis-trans Isomerism in Bis (L-valinato) copper (II)*. Inorganic chemistry, 2011. 50(8): p. 3632-3644.
- 117. Schilt, A.A. and R. Taylor, *Infra-red spectra of 1: 10-phenanthroline metal complexes in the rock salt region below 2000 cm*-1. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 1959. **9**(3-4): p. 211-221.
- Ramachandran, E. and S. Natarajan, *Synthesis of L-valine crystals*. Crystal Research and Technology: Journal of Experimental and Industrial Crystallography, 2009. 44(6): p. 641-646.
- 119. RAMOS, J.M.T.D.A., Estudo espectroscópico vibracional de complexos de Ni (II) com os aminoácidos serina, glicina e ácido guanidoacético.
- Phiri, J., P. Gane, and T.C. Maloney, *General overview of graphene: Production, properties and application in polymer composites.* Materials Science and Engineering: B, 2017. 215: p. 9-28.
- 121. Jackovitz, J. and J. Walter, *Infrared absorption spectra of metal-amino acid complexes*—V. *The infrared spectra and normal vibrations of metal-leucine chelates*. Spectrochimica Acta, 1966. **22**(8): p. 1393-1406.
- 122. Baskaran, S., et al., *DFT analysis and DNA binding, cleavage of copper (II) complexes.* Journal of Molecular Liquids, 2016. **221**: p. 1045-1053.
- 123. Fayad, N.K., et al., Synthesis, Characterization, and Antibacterial Studies of Mn (II), Fe (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Cd (II) Mixed-Ligand Complexes Containing Amino Acid (L-Valine) And (1, 10-phenanthroline). Synthesis, 2013. **3**(5).
- 124. Silverstein, R.M. and G.C. Bassler, *Spectrometric identification of organic compounds*. Journal of Chemical Education, 1962. **39**(11): p. 546.
- Noguchi, T. and M. Sugiura, *FTIR detection of water reactions during the flash-induced S-state cycle of the photosynthetic water-oxidizing complex.* Biochemistry, 2002.
 41(52): p. 15706-15712.
- 126. Nakamoto, K., Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry. 2009, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
- 127. Datta, S., et al., *Magnetic measurements, Raman and infrared spectra of metal–ligand complex derived from* $\$ *box {CoCl} _ {2}\cdot box {6H} _ {2}\box {0} \$\$ and 2-benzoyl pyridine.* Bulletin of Materials Science, 2018. **41**(2): p. 60.
- 128. Kumar, R., et al., Structural and vibrational characteristics of a non-linear optical material 3-(4-nitrophenyl)-1-(pyridine-3-yl) prop-2-en-1-one probed by quantum chemical computation and spectroscopic techniques. Journal of Molecular Structure, 2018. **1164**: p. 180-190.

- 129. Kolesov, B. and E. Boldyreva, *Difference in the dynamic properties of chiral and racemic crystals of serine studied by raman spectroscopy at 3–295 k*. The Journal of Physical Chemistry B, 2007. **111**(51): p. 14387-14397.
- 130. Herlinger, A.W., S.L. Wenhold, and T.V. Long, *Infrared spectra of amino acids and their metal complexes*. *II. Geometrical isomerism in bis (amino acidato) copper (II) complexes*. Journal of the American Chemical Society, 1970. **92**(22): p. 6474-6481.
- 131. Kumar, S., *Spectroscopic studies of valine and leucine molecules a comparative study*. Elixir Vib. Spec, 2011. **39**: p. 4996-4999.
- 132. Ramos, J.M., et al., Fourier transform infrared spectrum, vibrational analysis and structural determinations of the trans-bis (glycine) nickel (II) complex by means of the RHF/6-311G and DFT: B3LYP/6-31G and 6-311G methods. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2007. **68**(5): p. 1370-1378.
- 133. Jarmelo, S., P. Carey, and R. Fausto, *The Raman spectra of serine and 3, 3-dideutero*serine in aqueous solution. Vibrational spectroscopy, 2007. **43**(1): p. 104-110.
- 134. Lima Jr, J., et al., *Raman scattering of L-valine crystals*. Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering, 2005. **36**(11): p. 1076-1081.
- 135. Lombardi, D.R., et al., *Quantitative and qualitative analysis of some inorganic compounds by Raman spectroscopy*. Applied spectroscopy, 1994. **48**(7): p. 875-883.
- 136. Wagner, C.C. and E.J. Baran, *Vibrational spectra of bis (L-methioninato) copper (II)*. Acta Farmacéutica Bonaerense, 2002. **21**(4): p. 287-290.
- 137. Tamer, Ö., D. Avcı, and Y. Atalay, A novel Cu (II) complex of Picolinate and 1, 10phenanthroline: Preparation, crystal structure determination, spectroscopic characterization and nonlinear optical studies. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2017. **27**(3): p. 700-713.
- 138. Zhong, G.-Q. and Q. Zhong, *Solid-solid synthesis, characterization, thermal decomposition and antibacterial activities of zinc (II) and nickel (II) complexes of glycine-vanillin Schiff base ligand.* Green Chemistry Letters and Reviews, 2014. **7**(3): p. 236-242.
- 139. Cavaliere, R., et al., *Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies.* Cancer, 1967. **20**(9): p. 1351-1381.
- 140. Francisquine, E., J. Schoenmaker, and J.A. Souza, *Nanopartículas magnéticas e suas aplicações*. Química Supramolecular e Nanotecnologia, 2014: p. 269.
- 141. Faria, R.N. and L.F. Lima, *Introdução ao magnetismo dos materiais*. 2005: Editora Livraria da Física.
- 142. Manukyan, A., et al., Ferromagnetism and giant paramagnetism of copper nanoparticles in Cum/C nanocomposites. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2019. **488**: p. 165336.
- 143. Mroueh, M., et al., Magnetic property, DFT calculation, and biological activity of bis [(μ2-chloro) chloro (1, 10-phenanthroline) copper (II)] complex. Chemico-biological interactions, 2015. 231: p. 53-60.
- 144. Falleiros, J.P.B., A.L. Brandl, and A.R.A. da Fonseca, *Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer*. Nucleus, 2011. **8**(1): p. 1-20.
- 145. Rajput, A., et al., *Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model.* Journal of Surgical Research, 2008. **147**(2): p. 276-281.
- 146. Zhang, J., et al., Copper (II) Complexes Based on Aminohydroxamic Acids: Synthesis, Structures, In Vitro Cytotoxicities and DNA/BSA Interactions. Crystals, 2018. 8(5): p. 201.

- 147. Soliman, A.A., et al., Cobalt and copper complexes with formamidine ligands: Synthesis, crystal X-ray study, DFT calculations and cytotoxicity. Polyhedron, 2019. 161: p. 213-221.
- 148. Etaiw, S.E.H. and S.N. Abdou, New organotin supramolecular complexes based on copper cyanide and auxiliary N-donor ligands as potent inhibitors of cancer cell lines: In vitro and antioxidant experiments. Applied Organometallic Chemistry, 2018. 32(2): p. e4053.
- 149. Shier, W.T., *Mammalian cell culture on \$5 a day: a laboratory manual of low cost methods.* Los Banos, University of the Philippines, 1991. **64**(8): p. 9-16.
- 150. Amer, S., N. El-Wakiel, and H. El-Ghamry, Synthesis, spectral, antitumor and antimicrobial studies on Cu (II) complexes of purine and triazole Schiff base derivatives. Journal of Molecular Structure, 2013. **1049**: p. 326-335.